



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Centro de Investigaciones en Ciencias
Microbiológicas
Maestría en Ciencias Área Microbiología



**EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL
COMPLEJO PROTEICO DE LA ARN
POLIMERASA DE SARS-COV-2**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

Q.F.B.T. Zyanya Bravo Hernández

ASESOR DE TESIS:

D. en C. Claudia F. Martínez de la Peña

D. en C. Gerardo Santos López

PUEBLA, PUE. 01 / 26

Puebla, Pue. a 23 de enero 2026

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA CICM-ICUAP
P R E S E N T E.

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de Maestría de la alumna **Zyanya Bravo Hernández**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Expresión y caracterización del complejo proteico de la ARN polimerasa de SARS-CoV-2"

A nuestro juicio, la alumna **Zyanya Bravo Hernández** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Alberto Ramírez Mata


D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia


D.C. María Azucena Castañeda Montes


D.C. Luis Márquez Domínguez



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (SECIHTI) por el apoyo económico que me otorgó durante el desarrollo de este proyecto.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por las facilidades prestadas durante el desarrollo de esta Tesis.

Al laboratorio de Virología Médica del CIBIOR en el Instituto Mexicano del Seguro Social en Atlixco, Puebla.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis.

Al D.C. Gerardo Santos López por ser mi guía en todo este proceso y tenerme la paciencia necesaria, por siempre creer en mi y motivarme a mejorar constantemente. Gracias por mostrarme el maravilloso mundo de la ciencia y los virus.

A la D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña por la enseñanza en el mundo de la bioinformática, la paciencia y tiempo disponible siempre para un alumno.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Gracias a mi madre y a mi padre por siempre estar ahí para mí, escucharme y entenderme, aunque me digan que a veces no entienden lo que hago. Gracias por ayudarme a ser una persona honesta, trabajadora y responsable.

Gracias a mis compañeros en el laboratorio de Virología, por siempre ser solidarios, cálidos y de buen corazón. Son seres brillantes y breves. A Eri, Lore, Chema, Donovan, Dani, Nina, Brian y Lau por ayudarme y apoyarme cuando me surgía alguna duda o problema.

Al Dr. Luis por guiarme desde cero en procesos básicos pero nuevos para mí en el laboratorio y darnos los mejores consejos.

A mis vidas eternas Lore y Eri, las quiero muchísimo gracias por mostrarme que se puede tener amigos sinceros y verdaderos. Por escucharme, motivarme, aconsejarme y ser las mejores amigas que he tenido en muchísimo tiempo.

A mi Melissa Escalante por ser mi confidente, mejor amiga, compartir la neurodivergencia conmigo, su amor por las cositas de Kitty y empatía en situaciones de caos del posgrado, por estudiar conmigo, practicar conmigo y estar siempre para mí. De las mejores cosas que me pudo regalar Puebla.

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE.....	4
1 Resumen	14
2. INTRODUCCIÓN.....	15
2. 1. Pandemia por SARS-CoV-2.....	15
2. 1. 1. Impacto en salud pública y necesidad de terapias antivirales	16
3. ANTECEDENTES.....	17
3. 1. SARS-CoV-2: generalidades.....	17
3. 1. 1. Clasificación taxonómica	17
3. 1. 2. Estructura de los coronavirus	18
3. 1. 3. Transmisión y patogénesis	19
3. 1. 4. Respuesta Inmune.....	21
3. 2. Genoma del SARS-CoV-2.....	22
3. 2. 1. Organización del genoma.....	22
3. 2. 2. ORF1a/ORF1b y procesamiento de poliproteínas	22
3. 2. 3. Replicación y síntesis de proteínas de SARS-CoV-2	24
3. 2. 4. Mecanismos de traducción en coronavirus.....	27
3. 2. 5. Cambio programado en el marco de lectura.....	28
3. 2. 6. Conservación del FSE en betacoronavirus.....	31
3. 2. 7. Cómo el -1PRF regula la síntesis de la polimerasa y proteínas asociadas.....	32
3. 2. 8. Dinámica molecular de estructuras de ARN	33
3. 2. 9. El FSE como blanco potencial para antivirales.....	34
3. 3. Polimerasa de SARS-CoV-2 (complejo RdRp)	36
3. 3. 1. Composición: nsp12 (RdRp), nsp7 y nsp8 (auxiliares)	36

3. 3. 2. Función durante la replicación y transcripción	39
3. 4. Variantes del virus y resistencia antiviral.....	40
3. 5. Antivirales.....	43
3. 5. 1. Mecanismos de acción de antivirales actuales	43
3. 5. 2. Mutaciones en la RdRp asociadas a resistencia (remdesivir, molnupiravir y favipiravir)	46
4. JUSTIFICACIÓN.....	49
5. OBJETIVOS.....	50
5. 1. Objetivo general	50
5. 2. Objetivos específicos	50
6. DIAGRAMA DE TRABAJO	51
7. MÉTODOS.....	52
7. 1. Análisis de la conservación del FSE en betacoronavirus	52
7. 2. Predicción y visualización de la estructura secundaria del FSE en SARS- CoV-2.....	52
7. 3. Dinámica molecular del FSE en SARS-CoV-2	53
7. 4. Identificación de marcadores genéticos con resistencia a remdesivir	53
7. 5. Diseño los vectores para la expresión de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12 54	
7. 6. Preparación de células competentes	54
7. 7. Transformación con células competentes por choque térmico	55
7. 8. Extracción de plásmido por el método STET	55
7. 9. Preparación de gel de agarosa para electroforesis al 1%.....	56
7. 10. Digestión enzimática y clonación de los marcos de lectura de nsp7, nsp8 y nsp12 en pcDNA3.1	56
7. 10. 1. Digestión de plásmido pcDNA3.1	56

7. 10. 2.	<i>Digestión de los plásmidos pUCNSP7 y pUCNSP8</i>	57
7. 10. 3.	<i>Amplificación de marco de lectura de nsp12 por PCR</i>	58
7. 10. 4.	<i>Digestión del fragmento amplificado de nsp12</i>	59
7. 10. 5.	<i>Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa</i>	60
7. 10. 6.	<i>Ligación de los marcos de lectura en el vector pcDNA3.1</i>	60
7. 11.	<i>Extracción de ADN plasmídico mediante maxiprep</i>	61
7. 11. 1.	<i>Purificación del ADN plasmídico</i>	62
7. 11. 2.	<i>Clarificación del lisado y purificación en columna</i>	62
7. 11. 3.	<i>Elución del ADN plasmídico</i>	62
7. 12.	<i>Sistema de expresión Expi293.....</i>	63
7. 12. 1.	<i>Cultivo y mantenimiento de las células Expi293.....</i>	63
7. 12. 2.	<i>Transfección de células Expi293.....</i>	65
7. 13.	<i>Purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad</i>	66
7. 13. 1.	<i>Preparación de la muestra y condiciones de trabajo</i>	66
7. 13. 2.	<i>Procedimiento de purificación</i>	67
7. 13. 3.	<i>Manejo y mantenimiento de la columna HisTrap HP.....</i>	67
7. 14.	<i>Concentración de proteínas</i>	67
7. 15.	<i>Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....</i>	68
7. 16.	<i>Determinación de concentración de proteínas por nanofotometría.....</i>	68
7. 17.	<i>Separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida</i>	69
7. 17. 1.	<i>Preparación del sistema de corrida</i>	69
7. 17. 2.	<i>Preparación de muestras y corrida electroforética</i>	71
7. 18.	<i>Tinción de geles con azul de Coomassie.....</i>	72
7. 19.	<i>Tinción de geles con plata</i>	72

7. 20.	Detección de proteínas recombinantes mediante <i>Western Blot</i>	73
7. 20. 1.	<i>Transferencia de proteínas</i>	73
7. 20. 2.	<i>Bloqueo de membrana e incubación con anticuerpo anti-hexahistidina</i>	74
7. 20. 3.	<i>Detección de proteínas</i>	74
8.	RESULTADOS	75
8. 1.	Análisis de la conservación del FSE en betacoronavirus	75
8. 2.	Análisis en la predicción y visualización de la estructura secundaria del FSE en SARS-CoV-2	75
8. 3.	Análisis de marcadores de resistencia para remdesivir	79
8. 4.	Diseño de vectores de expresión para las proteínas nsp12, nsp7 y nsp8 de SARS-CoV-2	85
8. 5.	Construcción de plásmidos de expresión a partir de pCIN3.1.....	87
8. 6.	Construcción de plásmido de expresión pCDNSP7	89
8. 7.	Verificación y subclonación de los marcos de lectura en pcDNA3.1	90
8. 8.	Construcción y confirmación de los plásmidos de expresión	90
8. 9.	Verificación de los plásmidos pcDNSP7, pcDNSP8 y pcDNSP12	98
8. 10.	Expresión y purificación de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12.....	100
8. 11.	Identificación de proteínas de la RdRp de SARS-CoV-2	101
8. 12.	Identificación de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12 de SARS-CoV-2 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida	102
8. 13.	Tinción de azul de Coomassie y de plata para nsp7 de SARS-CoV-2	102
8. 14.	Tinción de azul de Coomassie y de plata para nsp8 de SARS-CoV-2	104
8. 15.	Tinción de azul de Coomassie y de plata para nsp12 de SARS-CoV-2	

8. 16. Identificación de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12 de SARS-CoV-2 mediante <i>Western blot</i>	109
9. DISCUSIÓN.....	114
10. PERSPECTIVAS	123
11. CONCLUSION.....	124
12. REFERENCIAS:.....	125

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Componentes con sus respectivos volúmenes para restricción enzimática de pCIN3.1 utilizando como enzimas BamHI y XhoI.	57
Tabla 2: Componentes con sus respectivos volúmenes para restricción enzimática de pUCNSP7 y pUCNSP8 utilizando como enzimas BamHI y XhoI.	57
Tabla 3: Componentes con sus respectivos volúmenes para reacción de PCR de pUCNSP12 utilizando MegaFi Pro Fidelity DNA Polymerase.....	58
Tabla 4: Pasos, temperaturas y tiempo de los ciclos correspondientes a la PCR utilizando MegaFi Pro Fidelity DNA Polymerase.	59
Tabla 5: Componentes con sus respectivos volúmenes para restricción enzimática del fragmento de PCR de pUCNPS12 utilizando BamHI y XhoI.	60
Tabla 6: Componentes con sus respectivos volúmenes para reacción de ligación utilizando T4 ADN Ligasa (Thermo Fisher Scientific).	61
Tabla 7: Densidades de siembra recomendadas para el mantenimiento rutinario de cultivos celulares.	64
Tabla 8: Volúmenes recomendados para el mantenimiento rutinario de cultivos celulares en matraces ventilados sin deflectores.	64
Tabla 9: Componentes con sus respectivos volúmenes para llevar a cabo 1 reacción de transfección en células Expi293.	65
Tabla 10: Componentes con sus respectivos volúmenes de los reactivos ExpiFectamine 293 Transfection Enhancer 1 y 2 necesarios para una reacción de transfección en células Expi293.	66

Tabla 11: Porcentaje de acrilamida/bisacrilamida dependiente del peso molecular de la proteína que se busca.	69
Tabla 12: Componentes con sus respectivos volúmenes para la preparación del gel separador en el SDS-PAGE dependiente del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida.	70
Tabla 13: Componentes con sus respectivos volúmenes para la preparación del gel concentrador en SDS-PAGE.	70
Tabla 14: Marcadores de resistencia para el antiviral remdesivir analizados en este trabajo.	80
Tabla 15: Secuencias descargadas de Norte, Centro y Sudamérica para análisis de marcadores de resistencia. Se muestra el total y las que tienen el ORF1ab para hacer la búsqueda específica del marco de lectura de nsp12.....	81
Tabla 16: Países de América donde se encontraron marcadores de resistencia a remdesivir.....	83
Tabla 17: Características moleculares de las proteínas recombinantes nsp7, nsp8 y nsp12 de SARS-CoV-2	87
Tabla 18: Oligonucleótidos T7 y BGH para plásmido de expresión pcDNA3.1	98
Tabla 19: Concentración de nsp7, nsp8 y nsp12 por fecha de purificación	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación de los coronavirus de importancia médica para los humanos. Gráfica construida a partir de la información del ICTV (https://ictv.global/)	17
Figura 2: Diagrama esquemático de una partícula de SARS-CoV-2. Se incluyen la espícula (spike, S), la proteína de la envoltura (E), la proteína de la membrana (M) y genoma de ARN monocatenario con sentido positivo y la proteína de la nucleocápside (N) (Santos-López, Cortés-Hernández, Vallejo-Ruiz, et al., 2021)	19
Figura 3: Organización del genoma de SARS-CoV-2. El ARN genómico presenta un capuchón (azul claro) en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el extremo 3'. Los primeros dos tercios de del genoma codifican para las poliproteínas pp1a y pp1ab,	

el último tercio codifica para las proteínas estructurales y accesorias (Santos-López, Cortés-Hernández, Reyes-Leyva, et al., 2021)	23
Figura 4: Interacción de la espícula de SARS-CoV-2 con el receptor ACE2 de la célula, seguida de la escisión producida por TMPRSS2 para la internalización del virus en la célula (Jamison Jr. et al., 2022)	24
Figura 5: Ciclo de infección en SARS-CoV-2 (Malone et al., 2022)	27
Figura 6: Representación esquemática del FSE en el -1PRF de SARS-CoV-2. El pseudonudo de tres tallos se compone de SL1 en rojo, SL2 en azul claro y SL3 en azul oscuro, se muestran las posiciones genómicas de los nucleótidos correspondientes (Pekarek et al., 2022).....	29
Figura 7 : Modelo donde se muestra la síntesis a partir de los marcos de lectura cuando no hay cambio y se obtiene pp1a, así como también cuando se genera el cambio de -1 nucleótido para la síntesis de la pp1ab (Malone et al., 2022).....	30
Figura 8: Estructuras del complejo de la RdRp de SARS-CoV-2 con una rotación de 90° hacia abajo. Código de colores: dominio NiRAN en guinda, interfaz en morado, dedos en gris, palma en naranja, pulgar en rojo, nsp7 en azul y nsp 8 en verde. El molde de ARN se muestra en azul y el producto de ARN en rojo. La esfera en color magenta representa un ion metálico en el sitio catalítico (Hillen et al., 2020).	37
Figura 9: Imagen ampliada de nsp12 que muestra el sitio catalítico con el NTP entrante, monofosfato de Remdesivir en representación de varillas y los cationes divalentes en esferas verdes. Los residuos conservados de Asp que interaccionan directamente con el NTP y la unión al Mg^{2+} . Val557 está involucrada en la resistencia a remdesivir y se muestra en varillas amarillas (Romano et al., 2020)	39
Figura 10: Estructura química de Molnupiravir, Remdesivir y Favipiravir (Kandwal & Fayne, 2023)	45
Figura 11: Molnupiravir se incorpora en su forma N-hidroxilamina frente a una Guanina. Posteriormente, puede tautomerizarse a una forma oximada, la cual se aparea con una Adenina en la replicación subsecuente, generando una mutación de guanina a adenina (Sanderson et al., 2023).....	47

Figura 12: Alineamiento de las secuencias consenso del FSE de MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2. Se resaltan nucleótidos conservados y variaciones clave en la región de -1PRF.....	75
Figura 13: Predicción computacional de la estructura secundaria del FSE de SARS-CoV-2 con RNAFold y Varna.....	76
Figura 14: Predicción computacional de la estructura secundaria del FSE de SARS-CoV-2 con x3DNADSSR y Varna.....	77
Figura 15: Simulación molecular de la estructura 3D del FSE de SARS-CoV-2. Se muestran las estructuras en los tiempos 0, 9595, 13837 y 15946 ns. Las regiones de horquilla atenuadora (verde), sitio deslizante (azul), espaciador (rojo) y pseudonudo (amarillo) se destacan para facilitar su comparación estructural.	78
Figura 16: Diseño esquemático de la secuencia para la expresión de la proteína nsp7 de SARS-CoV-2 en pcDNA3.1. Las letras en color negro sin resaltar corresponden al sitio de multiclonación del vector.	85
Figura 17: Diseño esquemático de la secuencia para la expresión de la proteína nsp8 de SARS-CoV-2 en pcDNA3.1. Las letras en color negro sin resaltar corresponden al sitio de multiclonación del vector.	86
Figura 18: Diseño esquemático de la secuencia para la expresión de la proteína nsp12 de SARS-CoV-2 en pcDNA3.1. Las letras en color negro sin resaltar corresponden al sitio de multiclonación del vector.	86
Figura 19: Mapa esquemático de plásmido pCIN3.1 (6090 pb). Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0.....	88
Figura 20: Restricción enzimática de pCIN3.1 con BamHI y XhoI.....	89
Figura 21: Mapa esquemático del plásmido pUCNSP7 (3079 pb) que contiene el ORF de nsp7. Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0	90
Figura 22: Análisis por restricción enzimática del plásmido pUCNSP7 utilizando las enzimas BamHI y XhoI, confirmando la presencia del ORF de nsp7	91
Figura 23: Mapa esquemático del plásmido de expresión pcDNSP7 (5825 pb), derivado del vector pcDNA3.1, que contiene el ORF de nsp7. Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0.....	92

Figura 24: Análisis por restricción enzimática del plásmido pcDNSP7 con BamHI y XhoI, mostrando la liberación del inserto correspondiente al ORF de nsp7	92
Figura 25: Mapa esquemático del plásmido pUCNSP8 (3421 pb) que contiene el ORF de nsp8. Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0.	93
Figura 26: Análisis por restricción enzimática del plásmido pUCNSP8 mediante digestión con BamHI y XhoI, confirmando la presencia del ORF de nsp8	93
Figura 27: Mapa esquemático del plásmido de expresión pcDNSP8 (6167 pb), basado en el vector pcDNA3.1, que contiene el ORF de nsp8. Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0.....	94
Figura 28: Análisis por restricción enzimática del plásmido pcDNSP8 con BamHI y XhoI, evidenciando la liberación del ORF de nsp8.....	95
Figura 29: Mapa esquemático del plásmido pUCNSP12 (5623 pb) que contiene el ORF de nsp12. Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0	96
Figura 30: Análisis por restricción enzimática del plásmido pUCNSP12 utilizando BamHI y XhoI, confirmando la presencia del ORF de nsp12	96
Figura 31: Mapa esquemático del plásmido de expresión pcDNSP12 (8390 pb), derivado del vector pcDNA3.1, que contiene el ORF de nsp12. Representación realizada en VectorBee versión 2.1.0.....	97
Figura 32: Análisis por restricción enzimática del plásmido pcDNSP12 con BamHI y XhoI, mostrando la liberación del inserto correspondiente al ORF de nsp12.....	98
Figura 33: Verificación por PCR del plásmido pcDNSP7, mostrando la amplificación del ORF de nsp7	99
Figura 34: Verificación por PCR del plásmido pcDNSP8, evidenciando la amplificación del ORF de nsp8.....	100
Figura 35: Verificación por PCR del plásmido pcDNSP12, mostrando la amplificación del ORF de nsp12.....	100
Figura 36: Tinción de Azul de Coomassie para la identificación de nsp7 de SARS-CoV-2. M - marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards de 250 kDa (1610374 Bio-Rad). Algunas de las bandas del marcador están marcadas con su tamaño en kDa	103

Figura 37: Tinción de plata para la identificación de nsp7 de SARS-CoV-2. M - marcador de peso molecular (1610374 Bio-Rad). Algunas de las bandas del marcador están marcadas con su tamaño en kDa	104
Figura 38: Tinción de Azul de Coomassie para la identificación de nsp8 de SARS-CoV-2. M - marcador de peso molecular (1610374 Bio-Rad). Algunas de las bandas del marcador están marcadas con su tamaño en kDa	105
Figura 39: Tinción de plata para la identificación de nsp8 de SARS-CoV-2. M - marcador de peso molecular (1610374 Bio-Rad). Algunas de las bandas del marcador están marcadas con su tamaño en kDa	106
Figura 40: Tinción de Azul de Coomassie para la identificación de nsp12 de SARS-CoV-2. M – marcador de peso molecular (1610374 Bio-Rad). Algunas de las bandas del marcador están marcadas con su tamaño en kDa	107
Figura 41: Tinción de plata para la identificación de nsp12 lote 1 y lote 2 sin concentrar de SARS-CoV-2	108
Figura 42: Tinción de plata para la identificación de nsp12 lote 1 de SARS-CoV-2	109
Figura 43: Western blot para la identificación de nsp7 de SARS-CoV-2	110
Figura 44: Western blot para la identificación de nsp8 de SARS-CoV-2	111
Figura 45: Western blot para la identificación de nsp12 lote 1 de SARS-CoV-2 .	112
Figura 46: Western blot para la identificación de nsp12 lote 2 de SARS-CoV-2.	113

1 Resumen

La COVID-19, es una enfermedad respiratoria altamente contagiosa causada por SARS-CoV-2, identificado por primera vez en Wuhan, China, en diciembre de 2019. Esta enfermedad ha ocasionado una pandemia de gran impacto en la salud pública. A fines de 2023, los efectos mayores de la epidemia han disminuido, la vacunación ha cumplido con parte de ese efecto y se han desarrollado algunos fármacos específicos para el tratamiento, sin embargo, aún no son de distribución global y aunque su efectividad está documentada, existen ya mutaciones virales asociadas con la resistencia a estos fármacos, así como limitaciones en algunos grupos de pacientes para su uso, por lo cual sigue siendo importante el desarrollo de nuevos fármacos para su tratamiento. Uno de los blancos farmacológicos más importantes de los coronavirus es su ARN polimerasa, constituida por tres proteínas no estructurales denominada ns7, ns8 y ns12. El propósito del presente proyecto es expresar este complejo proteico en cultivo de células humanas, purificarlas mediante cromatografía de afinidad para posteriormente identificar cada una de ellas. Este modelo enzimático tendrá aplicación a mediano plazo en el desarrollo de nuevos fármacos antivirales que serán abordados en proyectos posteriores.

2. INTRODUCCIÓN

2. 1. Pandemia por SARS-CoV-2

El 31 de diciembre de 2019 las autoridades de salud en China informaron a la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la aparición de un brote de neumonía de causa desconocida en la ciudad de Wuhan. En los primeros días de enero de 2020 se determinó que la causa era un coronavirus no descrito previamente. El 11 de febrero, el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, por sus siglas en inglés) lo designó como Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2), y la OMS denominó a la enfermedad infecciosa causada por este virus como enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19). Debido a la rápida propagación geográfica y al alarmante aumento en el número de casos la OMS el 11 de marzo del 2020 declaró la situación como una pandemia (Dabancha, 2021; B. Hu et al., 2021).

La COVID-19 se caracteriza por una serie de síntomas comunes que incluyen fiebre, tos, disnea, malestar general, fatiga, mialgias, artralgias, cefalea, odinofagia, anosmia, ageusia, diarrea y náuseas. Aunque también puede manifestarse de forma asintomática o con síntomas leves en algunos individuos, la manifestación respiratoria más grave es la neumonía, sin embargo, se puede presentar falla multiorgánica y una proporción de los casos son letales. En una buena parte de los pacientes recuperados de la infección se presentan secuelas de distinto tipo, que afectan los sistemas respiratorio, cardiovascular y nervioso, entidad conocida como COVID-19 prolongado. Estas secuelas pueden variar en cuanto a la gravedad y duración. Algunas de estas son: fatiga persistente, dificultades respiratorias crónicas, problemas cardíacos, daño pulmonar como la fibrosis pulmonar, problemas neurológicos, pérdida del gusto y el olfato a largo plazo y problemas gastrointestinales (Lippi et al., 2023).

2. 1. 1. Impacto en salud pública y necesidad de terapias antivirales

La pandemia causada por el SARS-CoV-2 representó uno de los mayores desafíos en salud pública a nivel global, y México fue uno de los países más afectados, tanto en términos de carga de enfermedad como de respuesta institucional. La elevada prevalencia de enfermedades crónicas, las desigualdades estructurales en el acceso a servicios médicos y las limitaciones del sistema sanitario mexicano influyeron significativamente en la alta mortalidad registrada durante los años críticos de la pandemia (De Fermin Sosa et al., 2022; Salinas-Aguirre et al., 2022)

En el ámbito nacional, se informó de una letalidad por COVID-19 del 18.4 % en pacientes con diabetes como comorbilidad única, mientras que ascendió al 38.7 % cuando se combinaban tres o más padecimientos metabólicos, como hipertensión, obesidad y enfermedades cardiovasculares. Con estos datos se refuerza la necesidad de fortalecer políticas de prevención de enfermedades crónicas como una estrategia integral de salud pública frente a futuras pandemias (Roldan Amaro et al., 2021).

La humanidad afrontó el desafío de la COVID-19 mediante el conocimiento y la tecnología disponibles en su momento, lo cual fue crucial para mitigar su impacto. Sin embargo, el SARS-CoV-2 se ha convertido en otro agente infeccioso respiratorio y, si bien ya no representa el mismo nivel de amenaza para la salud pública, persistirán los casos graves que requieren hospitalización y, lamentablemente, también se presentarán decesos. Por ello, persiste la necesidad de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos dirigidos al virus, que consideren la variabilidad genética de sus blancos moleculares y su posible relación con la resistencia a fármacos. En este sentido, estudiar y caracterizar de forma funcional la ARN polimerasa del SARS-CoV-2 constituye una estrategia con gran potencial para identificar alternativas antivirales eficaces, especialmente frente a nuevas variantes circulantes.

3. ANTECEDENTES

3. 1. SARS-CoV-2: generalidades

3. 1. 1. Clasificación taxonómica

Los coronavirus son el grupo más grande del orden *Nidovirales*. Pertenecen a la familia *Coronaviridae* (Figura 1). Son virus envueltos con genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. Se pueden encontrar en mamíferos y aves. Al ser observados en microscopía electrónica sobresale de la superficie un halo de espículas de 20 nm de largo que le da a la partícula viral la apariencia de corona solar al microscopio electrónico (Carballal & Oubiña, 2014; Fields et al., 2013).

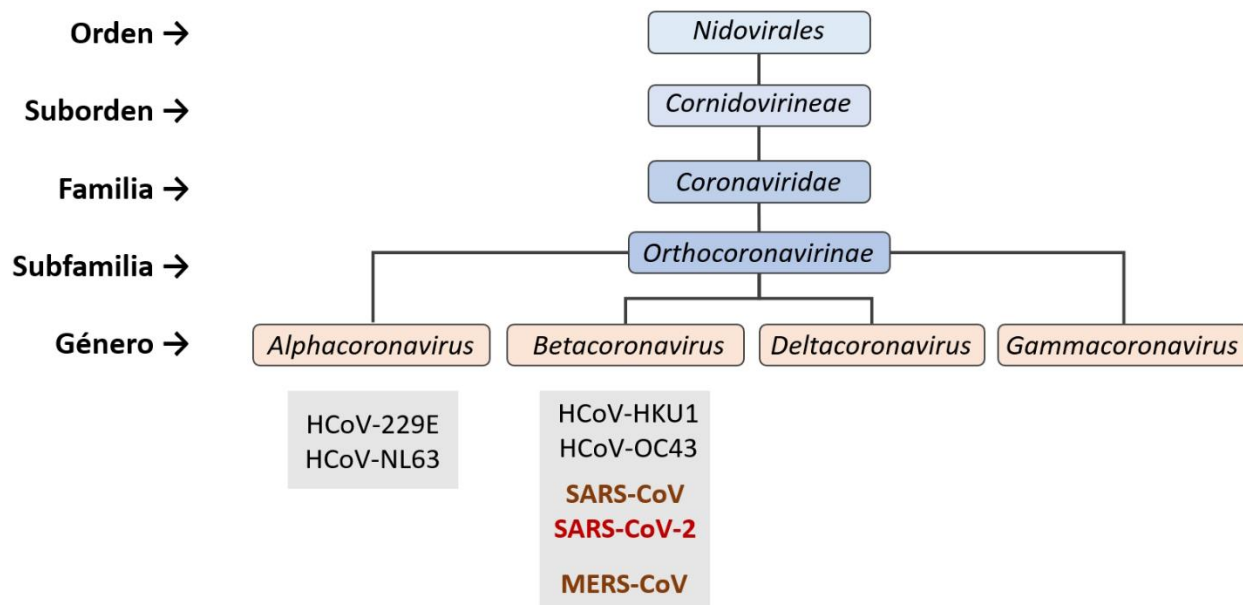


Figura 1: Clasificación taxonómica de los coronavirus humanos de relevancia clínica. Gráfica construida a partir de la información del ICTV (<https://ictv.global/>)

De acuerdo con el ICTV, la familia *Coronaviridae* contiene tres subgéneros, uno de ellos el *Orthocoronavirinae* es donde se encuentra SARS-CoV-2. En esta subfamilia hay cuatro géneros: *alfa*, *beta*, *gamma* y *deltacoronavirus*. Los *alphacoronavirus* y *betacoronavirus* suelen tener hospederos mamíferos (principalmente en

murciélagos) y los *gammacoronavirus* y *deltacoronavirus* solamente han sido aislados de hospederos aviares. Los coronavirus en humanos pueden causar tanto resfriado común (HCoV-NL63, HCoV-229E, Beta-CoV1, HCoV-OC43 y HCoV-HKU1) como enfermedades graves (SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2) (Carballal & Oubiña, 2014; Dabancha, 2021; Fields et al., 2013; Ravi et al., 2022; Santos-López et al., 2021).

Los coronavirus, particularmente los betacoronavirus, tienen como reservorios naturales a diversas especies de murciélagos, especialmente del género *Rhinolophus*. Entre ellos, se ha identificado el virus RaTG13, en *Rhinolophus affinis* en la provincia de Yunnan, China, que presenta un 96.2 % de identidad genómica con SARS-CoV-2, lo que sugiere un origen común. De forma similar, el virus RmYN02, aislado de *Rhinolophus malayanus*, muestra un 97.2 % de identidad en el gen 1ab con SARS-CoV-2. Estas similitudes respaldan la hipótesis de que el virus pandémico tiene un origen zoonótico. Aunque también se han detectado coronavirus relacionados en pangolines malayos traficados entre 2017 y 2019, y que comparten hasta un 92.4 % de identidad genómica con SARS-CoV-2, la evidencia actual no permite confirmar su papel como hospedero intermediario. La identificación de múltiples virus estrechamente relacionados en especies silvestres enfatiza la necesidad de comprender la evolución molecular de SARS-CoV-2 y su adaptación al ser humano, lo cual resulta esencial para el diseño de estrategias antivirales dirigidas a componentes clave como la ARN polimerasa viral (B. Hu et al., 2021).

3. 1. 2. Estructura de los coronavirus

Los viriones de los coronavirus presentan una forma esférica y una superficie rugosa, con un diámetro que oscila entre 80 y 120 nanómetros. Están recubiertos por una envoltura lipídica de la que emergen sus características espículas. Estas espículas, que confieren el aspecto de "corona", tienen forma de pétalo y se insertan en la membrana mediante un tallo, terminando en un extremo distal abultado en forma de foco o maza. En el interior del virión, protegida por la envoltura, se

encuentra la nucleocápside. Esta estructura es una ribonucleoproteína de simetría helicoidal que protege el material genético del virus (Carballal & Oubiña, 2014; Fields et al., 2013).

Posee cuatro proteínas estructurales importantes: la espícula (S), que es la más antigénica y le da la forma de corona solar al virus, la proteína de membrana (M), la cual le da estructura y estabilidad a la partícula viral, la proteína de envoltura (E), que tiene la función de canal iónico durante el ensamblaje de las partículas virales y salida del hospedero, y la proteína de la nucleocápside (N) que se encuentra en la nucleocápside y le da protección al genoma (Figura 2) (Santos-López et al., 2021)

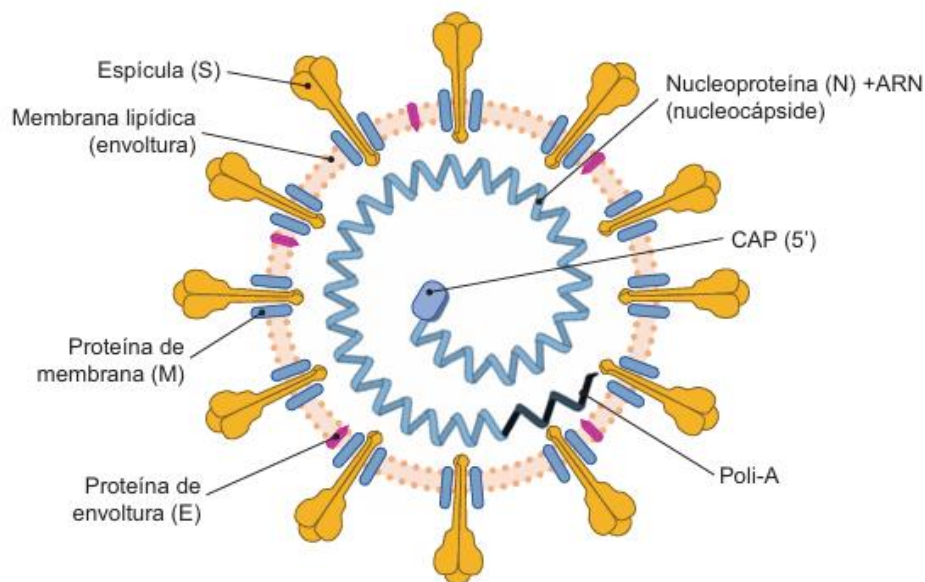


Figura 2: Diagrama esquemático de una partícula de SARS-CoV-2. Se incluyen la espícula (spike, S), la proteína de la envoltura (E), la proteína de la membrana (M) y genoma de ARN monocatenario con sentido positivo y la proteína de la nucleocápside (N) (Santos-López, Cortés-Hernández, Vallejo-Ruiz, et al., 2021)

3. 1. 3. Transmisión y patogénesis

Durante las últimas cuatro décadas, los coronavirus han sido objeto de estudio debido a su impacto económico, ya que provocan enfermedades respiratorias y gastrointestinales en animales domésticos. En humanos, se conocían

principalmente como agentes de resfriados comunes estacionales. Sin embargo, este panorama cambió drásticamente en el siglo XXI. En 2002, surgió en Guangdong (China) una nueva y devastadora enfermedad humana: el síndrome respiratorio agudo grave (SARS, por sus siglas en inglés), causado por un coronavirus hasta entonces desconocido, el SARS-CoV. Este virus, asociado a una mortalidad aproximada del 9%, causó alrededor de 8,000 casos confirmados en varios países. Se considera que su origen es zoonótico, con murciélagos del género *Rhinolophus* como reservorios naturales y civetas como probables hospederos intermediarios. Una década después, en 2012, emergió en Arabia Saudita el síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS). Este virus se caracteriza por un cuadro respiratorio grave con una letalidad superior al 30%. Al igual que el SARS, su origen es zoonótico y está asociado con murciélagos. El dromedario se identificó como el principal hospedero intermediario. Ambos patógenos pertenecen al género *Betacoronavirus*. (Hajjar et al., 2013; Pustake et al., 2022; Rabaan et al., 2022)

SARS-CoV-2 es mucho menos virulento que los dos coronavirus anteriores, sin embargo, este último logró propagarse rápidamente por todo el mundo llegando a causar una pandemia. SARS-CoV se propagó por todo el mundo hasta que fue controlado en 2003 y MERS-CoV, ha causado brotes esporádicos en entornos hospitalarios, sin propagación mundial. SARS-CoV-2 presenta una interacción más eficiente con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en comparación con SARS-CoV, debido a diferencias en su espícula, lo que le permite un mayor poder de unión a dicho receptor y, por tanto, una mayor capacidad para invadir células del hospedero. Además, muestra una afinidad mayor por el tracto respiratorio superior, lo que facilita una infección más eficiente. Se ha observado que la carga viral de SARS-CoV-2 alcanza su punto máximo en el tracto respiratorio superior al inicio de los síntomas y durante la primera semana de la enfermedad, a diferencia de SARS-CoV, cuya mayor carga viral ocurre en la segunda semana. Esto sugiere que SARS-CoV-2 posee su mayor potencial de transmisibilidad justo antes o dentro de los primeros cinco días del inicio de los síntomas (Hajjar et al., 2013; Rabaan et al., 2022; Ravi et al., 2022).

Cualquier población humana es susceptible a la infección por SARS-CoV-2, la mediana de edad de los pacientes es alrededor de 50 años. Los síntomas comunes de la COVID-19 varían dependiendo del grado de enfermedad, puede ser leve, moderada o severa. En casos de enfermedad leve los síntomas son fiebre, tos seca, malestar en el pecho, mialgias, anosmia, ageusia, anorexia, náuseas, vómitos y diarrea. Los casos graves por COVID-19 se producen principalmente en pacientes mayores a 60 años con comorbilidades como enfermedad crónica, patologías cardiovasculares, diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica y obesidad, las complicaciones en estos casos puede llevar a síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) con disnea e hipoxemia, infiltración pulmonar bilateral, linfopenia, falla renal, insuficiencia cardíaca, falla hepática, coagulopatías y puede requerir hospitalización. Hay pacientes que muestran COVID persistente donde se han reportado trastornos donde se tiene la pérdida de gusto y de olfato (Arandia-Guzmán & Antezana-Llaveta, 2020; B. Hu et al., 2021).

3. 1. 4. Respuesta Inmune

Durante la infección por SARS-CoV-2 se ha documentado una respuesta inmunitaria exacerbada similar a la observada en infecciones por SARS-CoV y otros virus respiratorios, caracterizada por una intensa liberación de mediadores proinflamatorios, fenómeno conocido como "tormenta de citocinas". Esta respuesta se distingue por niveles bajos de interferones tipo I y III, acompañados de una producción elevada de quimiocinas e interleucina-6 (IL-6), lo cual contribuye al deterioro clínico observado en pacientes con COVID-19 grave. En las células infectadas, los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) detectan estructuras de ARN aberrantes formadas durante la replicación viral, lo que activa rutas intracelulares que conducen a la activación de los factores de transcripción IRF y NF- κ B. Esta activación desencadena dos respuestas antivirales principales: la primera involucra la transcripción de interferones tipo I y III y la inducción de genes estimulados por interferones; la segunda se basa en el reclutamiento de subconjuntos específicos de leucocitos a través de la secreción de

quimiocinas. No obstante, en la infección por SARS-CoV-2 se ha observado una respuesta disfuncional caracterizada por una producción deficiente de interferones junto con una secreción excesiva de citocinas y quimiocinas inflamatorias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, G-CSF, IP-10, MCP-1 y MIP-1 α , lo que puede generar un ambiente inflamatorio sistémico que contribuye al daño pulmonar y multiorgánico (Arandia-Guzmán & Antezana-Llaveta, 2020)

3. 2. Genoma del SARS-CoV-2

3. 2. 1. Organización del genoma

Los coronavirus poseen un genoma de ARN monocatenario de cadena positiva, no segmentada de aproximadamente 30,000 nucleótidos. Contiene una capucha en el extremo 5' y una cadena de poli-A en el extremo 3'. De esta manera puede ser utilizado como ARN mensajero. El ARN puede traducirse para generar proteínas estructurales y no estructurales. A partir del ARN genómico del SARS-CoV-2 se generan una serie de ARN mensajeros conocidos como subgenómicos, los cuales permiten la expresión de diversas proteínas virales, principalmente estructurales y accesorias. Estos ARNm comparten una secuencia común en el extremo 3', característica que da lugar a su organización en forma de conjunto "anidado". Esta disposición es distintiva de los virus pertenecientes al orden *Nidovirales*, del cual forman parte los coronavirus (Santos-López, et al., 2021).

3. 2. 2. ORF1a/ORF1b y procesamiento de poliproteínas

El genoma de este virus se divide en tres secciones. Los primeros dos tercios del genoma codifican para dos marcos de lectura (ORF) ORF1a y ORF1ab, que dan origen a dos poliproteínas que se traslapan, denominadas pp1a y pp1ab, y que después de un procesamiento proteolítico forman 16 proteínas no estructurales (nsp). En este proceso intervienen dos proteasas: una proteasa similar a la quimotripsina (3CL), también denominada proteasa principal (Mpro) y una cisteína proteasa (PLpro). Mpro procesa la pp1ab en 11 sitios, mientras que, PLpro es parte

de una proteína transmembranal que escinde la pp1a en los límites nsp1/2, nsp2/3 y nsp3/4. El último tercio de los marcos de lectura codifica para proteínas estructurales como la S, E, M y N. Además de las proteínas accesorias 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b, que tienen diversas funciones (Figura 3). Estas últimas proteínas no se consideran esenciales para el ciclo de replicación de SARS-CoV-2, sin embargo, tienen distintas funciones en la señalización celular que es responsable de la actividad antiviral del hospedero (Arevalo et al., 2023; Ritesh et al., 2021; Romano et al., 2020).

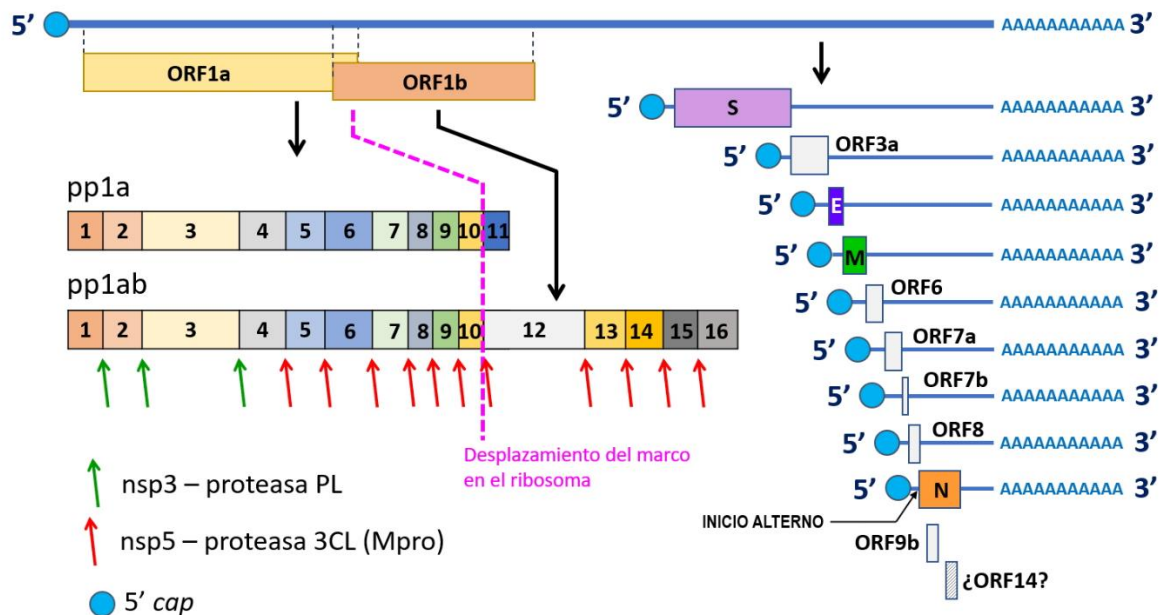


Figura 3: Organización del genoma de SARS-CoV-2. El ARN genómico presenta un capuchón (azul claro) en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el extremo 3'. Los primeros dos tercios de del genoma contienen los marcos de lectura ORF1a y ORF1b los cuales codifican para las poliproteínas pp1a y pp1ab. Las síntesis de pp1ab ocurre mediante un desplazamiento del marco de lectura ribosomal (-1 frameshift) en la región de solapamiento entre ORF1a y ORF1b. Las flechas indican sitios de corte proteolíticos. El último tercio codifica para las proteínas estructurales y accesorias (Santos-López, Cortés-Hernández, Reyes-Leyva, et al., 2021).

3. 2. 3. Replicación y síntesis de proteínas de SARS-CoV-2

La proteína S es una glicoproteína de fusión homotrimérica que se divide en dos subunidades (S1 y S2) con funciones distintas. La subunidad S1 está expuesta en la superficie y contiene el dominio de unión al receptor (RBD), que se une con el receptor de la célula hospedera, que es la proteína ACE2 (Figura 4). Este receptor se expresa en gran proporción en los neumocitos tipo II y el virus entra por endocitosis. Para la formación de un endosoma viral la subunidad S1 es escindida por la proteasa de la superficie celular TMPRSS2 (serina proteasa transmembranal 2), lo cual expone el dominio de fusión de la subunidad S2 que contiene las regiones de repetición heptada y el péptido de fusión que favorece la fusión de las membranas del endosoma y del virus (Figura 4). La acidificación del endosoma induce la liberación de la nucleocápside en el citoplasma y el genoma del virus es liberado, pasa a ser traducido directamente por los ribosomas para la producción de pp1a y pp1ab. La síntesis de pp1ab es resultante del desplazamiento ribosómico programado (Sanz et al., 2021; V'kovski et al., 2021).

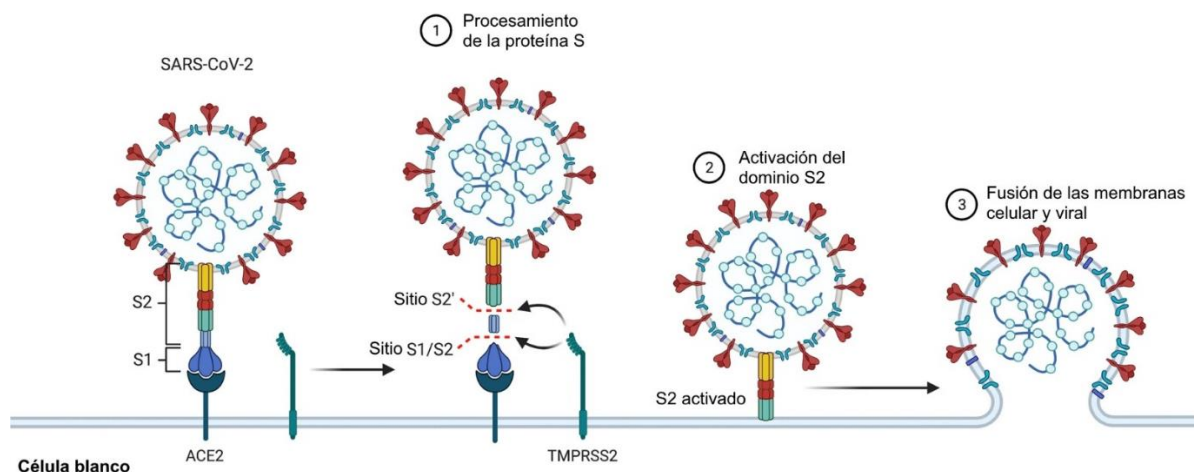


Figura 4: Interacción de la espícula de SARS-CoV-2 con el receptor ACE2 de la célula, seguida de la escisión producida por TMPRSS2 para la internalización del virus en la célula (Jamison Jr. et al., 2022).

A partir de pp1a y pp1ab con ayuda de las proteasas nsp3 (PLpro) y nsp5 (Mpro o 3CLpro) se obtienen las 16 nsp. Las nsp numeradas de 1 a 11, son aquellas que funcionan como apoyo para organizar el complejo de replicación-transcripción, evasión del sistema inmunitario y suministro de cofactores para el proceso de replicación. Las nsp 12 a la 16 actúan en la síntesis, corrección y la modificación del ARN. La síntesis del ARN viral en SARS-CoV-2 es llevada a cabo por la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), identificada como nsp12, la cual actúa en conjunto con sus cofactores nsp7 y nsp8. Se propone que nsp8 tiene actividad primasa o adenililtransferasa terminal en el extremo 3'. Un componente clave de este complejo es nsp14, que posee una actividad exonucleasa 3'-5', lo que permite una inusual función de corrección de errores durante la replicación del ARN. Además, el virus cuenta con una maquinaria especializada para la modificación y protección del extremo 5' del ARN, la cual aún no ha sido completamente caracterizada. Esta maquinaria incluye a nsp10, que actúa como factor activador, nsp13, que posee actividad ARN 5'-trifosfatasa, y las proteínas nsp14 y nsp16, que participan en las funciones de N7-metiltransferasa y 2'-O-metiltransferasa, respectivamente. Estas modificaciones son fundamentales para el camuflaje del ARN viral frente al sistema inmune del hospedero, así como para la estabilidad y traducción eficiente del genoma viral (V'kovski et al., 2021)

La replicación del genoma viral de SARS-CoV-2 comienza con la síntesis de copias completas de ARN de sentido negativo, las cuales actúan como plantillas para la generación de nuevos genomas virales de sentido positivo. Estos genomas recién sintetizados pueden servir como ARN mensajero para la traducción de las proteínas no estructurales que forman el complejo de replicación y transcripción, o bien ser empaquetados en nuevos viriones. Una característica distintiva de los coronavirus, y en general de los miembros del orden *Nidovirales*, es la utilización de un mecanismo denominado transcripción discontinua el cual da lugar a un conjunto de ARN subgenómicos (sgRNA) organizados de forma coterminales en los extremos 3' y 5', conocidos como ARN anidados. Este mecanismo permite la expresión diferencial

de proteínas estructurales y accesorias a partir de un único genoma viral (Figura 3). En el proceso de transcripción se forma una cadena negativa de ARN a partir del genoma, la cual juega un papel esencial en la interrupción y reinicio de este proceso. Hay secuencias reguladoras de la transcripción (TRS) ubicadas río arriba de la mayoría de los marcos de lectura abiertos en el tercio 3' del genoma viral. Las secuencias TRS, funcionan como puntos de control críticos. En estos sitios, la síntesis del ARN de cadena negativa se detiene y luego se reanuda en el TRS adyacente a una secuencia líder (TRS-L). Este proceso de síntesis de ARN es discontinuo y depende de la interacción entre las secuencias TRS complementarias del ARN de cadena negativa naciente (cuerpo de TRS de sentido negativo) y el ARN genómico de cadena positiva (TRS-L de sentido positivo). De esta manera produce la síntesis de las cadenas de ARN subgenómico (ARNsg) de cadena negativa, que actúan como plantillas para la síntesis de un conjunto anidado característico de ARN mensajero subgenómico de sentido positivo (ARNm-sg+) que posteriormente son traducidos en proteínas tanto estructurales como accesorias (V'kovski et al., 2021).

Los marcos de lectura de las proteínas estructurales (S, E, M y N) se ubican en el último tercio del genoma viral (Figura 3). Estas proteínas estructurales son cruciales para la formación y ensamblaje de nuevos viriones. Los ORF que codifican las proteínas accesorias se intercalan entre los ORF que codifican las proteínas estructurales. La etapa de ensamblaje de los nuevos viriones tiene lugar en el compartimento intermedio del retículo endoplásmico (RE) y el Golgi. Una vez ensamblados, los nuevos viriones se liberan de la célula infectada mediante vesículas en la membrana plasmática para abandonar la célula por exocitosis (Figura 5) (Santos-López, Cortés-Hernández, Vallejo-Ruiz, et al., 2021; V'kovski et al., 2021)

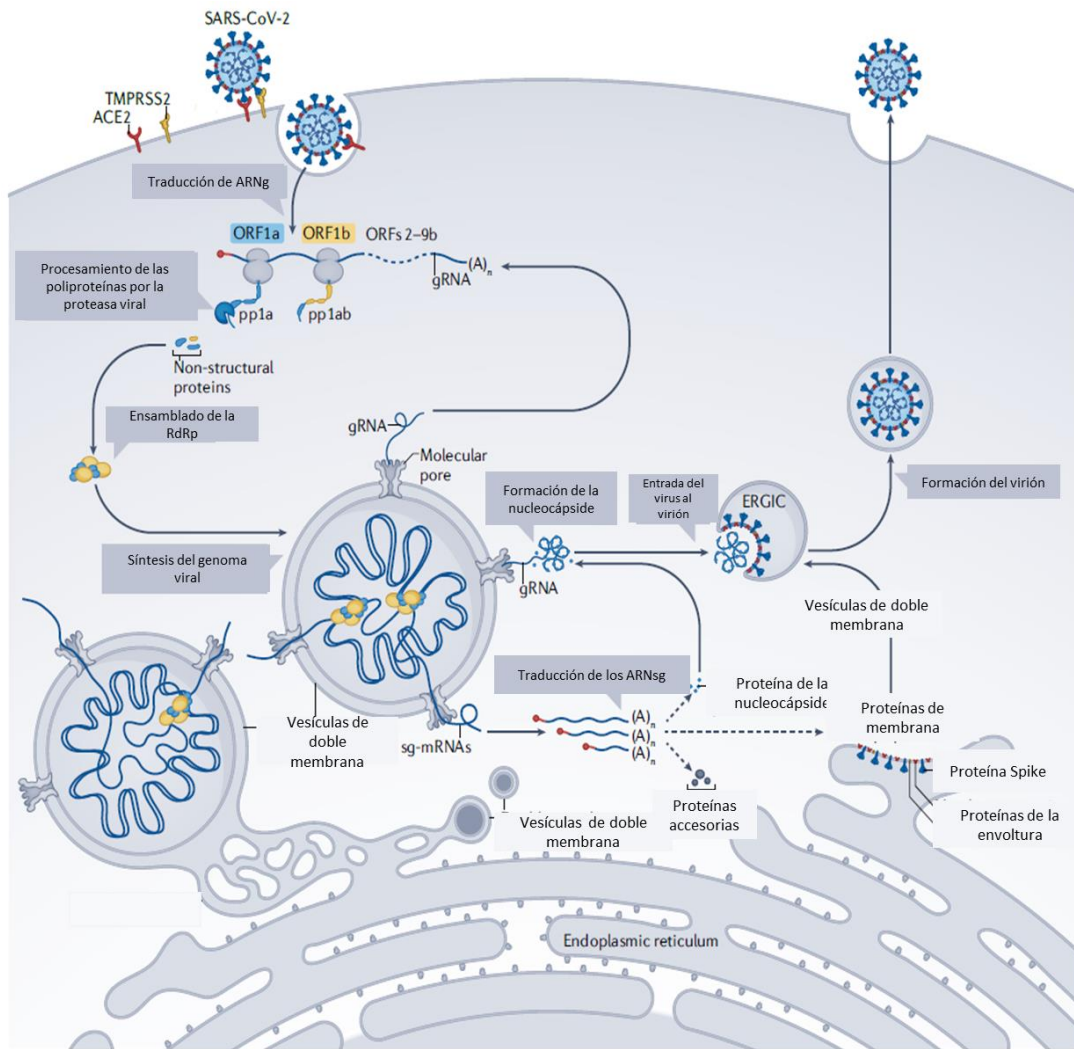


Figura 5: Ciclo de infección en SARS-CoV-2 (Malone et al., 2022)

3. 2. 4. Mecanismos de traducción en coronavirus

Las primeras proteínas sintetizadas a partir del ORF1a codifican la poliproteína pp1a, de la cual se derivan las proteínas no estructurales (nsps) 1 a 16. Las nsp de la 1 a la 11 desempeñan funciones cruciales en la organización del complejo de replicación-transcripción, la evasión del sistema inmunitario y el suministro de cofactores esenciales para el proceso de replicación. Posteriormente, la poliproteína pp1ab se obtiene a partir del ORF1ab, lo que resulta en la producción de las nsp 12

a 16, que participan en la síntesis, corrección y modificación del ARN (Ritesh et al., 2021; Woo et al., 2023).

El mecanismo funciona de tal manera que ORF1b está fuera de marco con respecto a ORF1a. Todos los coronavirus utilizan un mecanismo molecular conocido como cambio de marco de lectura ribosomal -1 (-1 PRF) para sintetizar las proteínas codificadas por ORF1b. El -1 PRF es un mecanismo mediante el cual, elementos en cis en el ARNm dirigen a los ribosomas en elongación para cambiar el marco de lectura en una base en la dirección 5' (Hillen et al., 2020; Kelly, N. Olson, et al., 2020; Kelly, Woodside, et al., 2020; Ritesh et al., 2021).

3. 2. 5. Cambio programado en el marco de lectura

En la región de superposición para el cambio de marco de lectura, hay un elemento de ARN que funciona localmente y que dirige una fracción de ribosomas durante la síntesis del péptido para que se deslicen un nucleótido en la dirección 5' en un proceso llamado desplazamiento de marco 5'→ 3' que conforman lo que será el elemento estimulador de cambio de marco (FSE): el "sitio resbaladizo", una región conectora y una estructura secundaria del ARNm la cual generalmente es un pseudonudo con tres tallos (Figura 6).

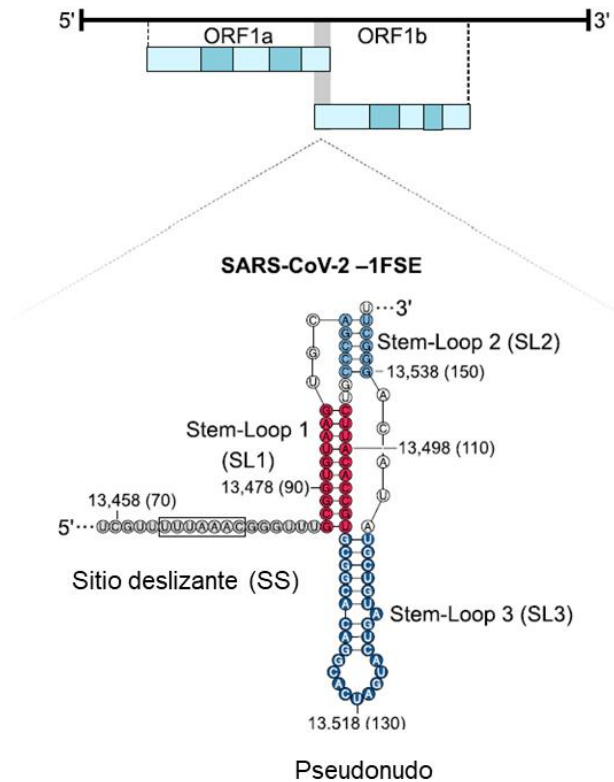


Figura 6: Representación esquemática del FSE en el -1PRF de SARS-CoV-2. El pseudonudo de tres tallos se compone de SL1 en rojo, SL2 en azul claro y SL3 en azul oscuro, se muestran las posiciones genómicas de los nucleótidos correspondientes (Pekarek et al., 2022).

La secuencia del “sitio resbaladizo” y su ubicación en relación con el marco de lectura entrante es crítica: debe ser N NNW WWZ (los codones se muestran en el marco entrante o también llamado marco 0), donde NNN es un tramo de tres nucleótidos idénticos, WWW es AAA o UUU y Z ≠ G. Tras el cambio de marco de -1, los ribosomas pueden continuar traduciendo las proteínas codificadas por el ORF1b, lo que permite la progresión del ciclo de replicación viral. La región conectora está menos definida, pero normalmente es corta (de 1 a 12 nucleótidos de largo). El mecanismo generalmente aceptado de -1 PRF es que la estructura secundaria del ARNm dirige a los ribosomas que están en proceso de transcripción a realizar una pausa con sus aminoácidos y enlaces peptídicos de los ARNt unidos a los sitios A y P colocados sobre el sitio resbaladizo. La conformación de los ARNt

y el sitio resbaladizo es tal que, tras un evento de deslizamiento -1, las bases no variables del ARNt pueden reemparejarse con los codones del marco -1 (Figura 7) (Kelly, Woodside, et al., 2020; Trinity et al., 2023).

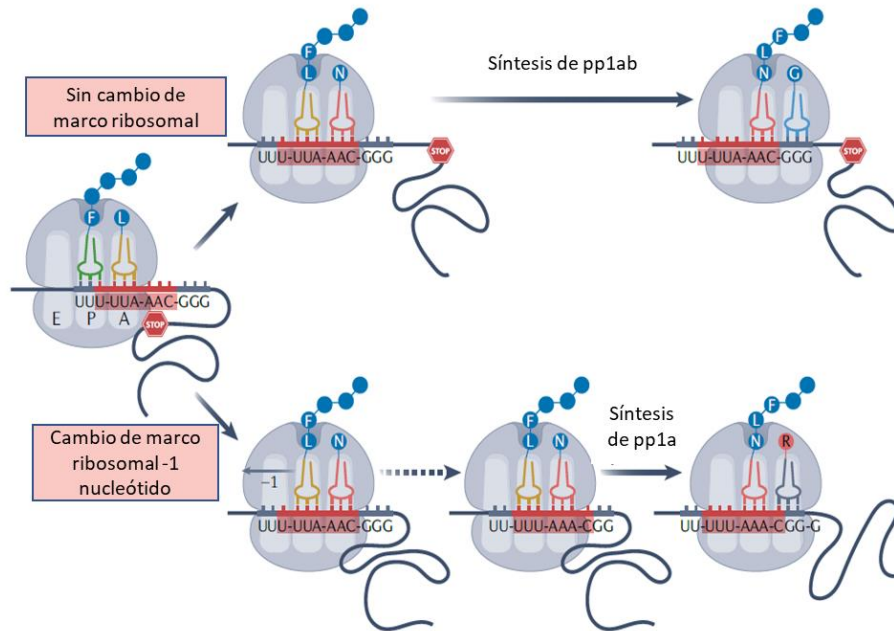


Figura 7 : Modelo donde se muestra la síntesis a partir de los marcos de lectura cuando no hay cambio y se obtiene pp1a, así como también cuando se genera el cambio de -1 nucleótido para la síntesis de la pp1ab (Malone et al., 2022).

La resolución posterior de la estructura secundaria del ARNm río abajo permite que el ribosoma continúe la elongación del polipéptido naciente mediante un nuevo marco de lectura traduccional. Los elementos estimuladores son comúnmente pseudonudos de ARNm de tipo H, son llamados así porque están compuestos por dos bucles de tallos apilados uno sobre el otro, donde el segundo tallo se forma mediante el emparejamiento de bases entre la secuencia en el bucle del primer tallo y secuencia río abajo adicional (Kelly, N. Olson, et al., 2020; Kelly, Woodside, et al., 2020).

3. 2. 6. Conservación del FSE en betacoronavirus

Evidencias filogenéticas y genéticas demuestran que los alfa y betacoronavirus comparten la estructura común de pseudonudo con tres tallos, en contraste con la estructura de dos tallos observada en la mayoría de los pseudonudos estimuladores de otros virus. Esta arquitectura de tres tallos está altamente conservada entre los betacoronavirus y parece ser exclusiva de esta familia. El pseudonudo del SARS-CoV-2 es casi idéntico en secuencia al del SARS-CoV, diferenciándose únicamente en que presenta una adenina en lugar de una citosina en la posición 13,533 del bucle 3. Los análisis de variaciones de la secuencia del SARS-CoV-2 revelan la naturaleza altamente conservada de la señal de -1 PRF, lo que subraya la importancia de este elemento para la capacidad de replicación viral. Los tallos 1 y 2 de los pseudonudos del SARS-CoV y SARS-CoV-2 son esenciales para promover el -1 PRF, mientras que el tallo 3 parece tener una función de estimulación adicional actualmente desconocida (Kelly, Woodside, et al., 2020; Trinity et al., 2023).

La posición del codón de terminación en el marco 0 juega un papel fundamental en la eficiencia del -1 PRF. Se propone que el proceso de terminación por un ribosoma líder facilita el replegamiento del pseudonudo antes de la llegada de un ribosoma subsiguiente. Las señales de -1 PRF en SARS-CoV y SARS-CoV-2 incluyen un elemento de "horquilla atenuadora" 50 nucleótidos río arriba del sitio resbaladizo, que previene el deslizamiento hacia atrás del ribosoma y contribuye a la eficiencia del -1 PRF. De acuerdo con diversos estudios de dinámica conformacional, el ribosoma detecta el sitio resbaladizo y está predispuesto para realizar un deslizamiento hacia atrás en el marco de lectura de sólo un nucleótido, pero necesita una señal adicional. Esta señal adicional es la horquilla, que tiene el papel de una barrera física con el propio ribosoma para evitar que este mismo siga avanzando, experimentando tensión mecánica que lo hace propenso a regresarse solo un nucleótido en el sitio deslizante, cambiando el marco de lectura en -1. Posterior al deslizamiento el ribosoma tiene una "nueva configuración" y se obtiene un nuevo marco de lectura para dar origen a pp1ab (Chang & Wen, 2021; Malone et al., 2022).

Algunos análisis computacionales indican que la señal de -1 PRF del SARS-CoV-2 está integrada en un dominio estructural mayor de ARN que adopta una estructura de doble hebra. La secuencia primaria de la horquilla atenuadora muestra menos conservación entre SARS-CoV y SARS-CoV-2. Sin embargo, estudios genéticos indican que ambos elementos han mantenido su funcionalidad, lo que sugiere una conservación funcional de gran importancia (Malone et al., 2022; Penn & Mukhopadhyay, 2022)

3. 2. 7. Cómo el -1PRF regula la síntesis de la polimerasa y proteínas asociadas

Durante el proceso de -1 PRF, cuando los ribosomas cambian de marco desde el ORF1a al ORF1b con la ayuda del complejo FSE, se permite la traducción de la poliproteína pp1ab. Esto conduce a la producción de proteínas esenciales para el complejo de RTC, como la RdRp de SARS-CoV-2. La eficiencia del -1 PRF determina la proporción adecuada entre los productos del ORF1a (nsp1-11) y del ORF1b (nsp12-16). Por lo tanto, un cambio de marco eficaz es crucial para la disponibilidad de nsp12 y el ensamblaje correcto del RTC (Karousis et al., 2024; Li et al., 2021; Malone et al., 2022)

Algunos estudios han demostrado que la inhibición de -1 PRF reduce en gran proporción la producción de nsp12 en células Vero infectadas y con esto se disminuye directamente la replicación viral. Con ello se pone de manifiesto que la síntesis de nsp12 está estrechamente vinculada con el -1 PRF. La modulación de -1 PRF no solo es una estrategia para la alteración de la producción de nsp, si no de reducir específicamente la síntesis de nsp12, lo cual compromete directamente la actividad de replicación y transcripción de SARS-CoV-2 (Kelly, N. Olson, et al., 2020; Sun et al., 2021)

3. 2. 8. Dinámica molecular de estructuras de ARN

La estructura del FSE en SARS-CoV-2 se ha determinado a una resolución de 2.09 Å mediante cristalografía asistida por chaperonas. La estructura reveló un pseudonudo de tipo H que está conformado por tres tallos apilados verticalmente y estabilizados por dos interacciones triples en las uniones S1-S2 y S1-S3. Estos resultados difieren en modelos previos que fueron obtenidos por crio-microscopía electrónica, que muestran una conformación plegada. La comparación de ambas estructuras sugiere que el elemento puede alternar entre diferentes conformaciones, lo cual podría influir en la eficiencia del cambio de marco de lectura -1 (-1 PRF) y, en consecuencia, en la proporción de las nsp producidas durante la traducción viral (Malone et al., 2022; Roman et al., 2021).

Durante la tracción, el ribosoma encuentra el pseudonudo de tres tallos que se forma por el FSE y ejerce una fuerza mecánica para que se pueda desenrollar, generando una tensión que induce un movimiento de tipo “rodadura” en la subunidad 30S del ribosoma. Este movimiento conocido como “trinquete” va distorsiona el ARNt que está ubicado en el sitio A/P, de esta forma se debilitan las interacciones de codón con anticodón y se favorece el deslizamiento del ARNt hacia -1 nucleótido. La comprensión del detalle a nivel atómico y dinámico en el proceso abre la puerta al diseño de nuevas vías para terapias antivirales que puedan interferir con la dinámica molecular de -1 PRF (Chang et al., 2019; Malone et al., 2022).

Por lo tanto, en el ribosoma y en el ARNm hay distintas dinámicas conformacionales que facilitan el cambio -1 PRF durante la translocación, las cuales son reguladas por estas estructuras secundarias que posee el ARNm. Estas estructuras son flexibles y no son estáticas, su conformación va cambiando de acuerdo a la tensión que vaya ejerciendo el ribosoma. Se han utilizado técnicas de microscopía electrónica (cryo-EM) y simulaciones de dinámica molecular (MD) para validar el modelo propuesto (Chang & Wen, 2021).

3. 2. 9. El FSE como blanco potencial para antivirales

Estudios recientes han demostrado que las mutaciones que afectan la estructura del -1 PRF tienen efectos nocivos sobre la propagación del virus, lo que sugiere que esta estructura puede ser un objetivo terapéutico. Trabajos anteriores sobre SARS-CoV encontraron que los ácidos nucleicos peptídicos antisentido (PNA) podrían inhibir tanto el -1 PRF como la replicación del virus. Los PNA son oligonucleótidos diseñados de manera sintética para que se unan al ARN de una manera específica. Se han desarrollado estrategias para la inhibición del -1 PRF, basado en la formación de un dúplex río arriba del sitio deslizante en la región 3'. Con ensayos en células *in vitro* en células 293T, se demostró que un dúplex de ARN-ADN proximal al sitio de cambio atenúa el -1 PRF significativamente. En MERS-CoV, autores han identificado dos posibles pseudonudos funcionales y han mostrado que un antisentido 2'-O-metilado dirigido a la región río arriba es capaz de reducir la eficiencia del -1 PRF en células humanas (Hu et al., 2015; Kelly, Woodside, et al., 2020)

En estudios recientes se ha demostrado que el compuesto MTDB (2-[[4-(2-methylthiazol-4ylmethyl)-[1, 4]diazepane-1-carbonyl]-amino]-benzoic acid ethyl ester) inhibe el proceso -1 PRF en SARS-CoV, esto evidencia la existencia de inhibidores del cambio de marco en el SARS-CoV-2 y podría existir la posibilidad de que el pseudonudo estimulador del cambio de marco sea un objetivo terapéutico (Kelly, Woodside, et al., 2020)

En otro estudio, se utilizó el programa Shapify para la predicción de la estructura de pseudonudo de ARN basado en la hipótesis del plegamiento jerárquico al tiempo que incorpora datos de reactividad, para proporcionar nuevos conocimientos sobre la estructura del pseudonudo -1 PRF del SARS-CoV-2. En este ensayo se demuestra una eficacia notable en la predicción de estructuras secundarias de ARN tanto horquillas como pseudonudos. A través de esta herramienta, se identificaron múltiples conformaciones estructurales para betacoronavirus como SARS-CoV-2 y MERS-CoV. Estos hallazgos indican que el SARS-CoV-2 posee varias vías estructurales para la formación del pseudonudo, lo que sugiere una capacidad

innata del virus para alcanzar su estructura funcional. Los resultados subrayan la relevancia de considerar conformaciones transitorias y subóptimas para una comprensión más profunda de la función viral y el desarrollo de antivirales que tengan como objetivo estas estructuras secundarias. La capacidad de SARS-CoV-2 de mantener su función de cambio de marco a través de diferentes estructuras refleja una robustez que podría ser esencial para su capacidad de replicación y virulencia. Esto resalta la necesidad de considerar diversas estructuras potenciales al diseñar terapias que apunten a interferir con el proceso de cambio de marco de lectura (Trinity et al., 2023).

Se han realizado experimentos que demuestran que la merafloxacin, un compuesto de la clase de las fluoroquinolonas, inhibe de manera específica y robusta el cambio de marco ribosomal (-1 PRF) en betacoronavirus, incluyendo SARS-CoV-2. La inhibición del -1 PRF por parte de la merafloxacin bloqueó la replicación del SARS-CoV-2 en células Vero, se cuantificó la abundancia de nsp8 y nsp12 codificados por ORF1a y ORF1b para comprobar el bloqueo. La relación de abundancia entre estas dos proteínas disminuyó significativamente con la merafloxacin, sugiriendo que la focalización del -1 PRF es una estrategia antiviral viable para SARS-CoV-2 y otros coronavirus. La merafloxacin mostró una eficacia similar en la inhibición del -1 PRF en ambos coronavirus ($IC_{50} = 20 \mu M$). El mecanismo molecular por el cual la merafloxacin inhibe el cambio de marco ribosomal (-1 PRF) aún no se comprende completamente. Una hipótesis sugiere que la merafloxacin podría unirse directamente al FSE del ARN, desestabilizando la conformación del pseudonudo y reduciendo la pausa de los ribosomas, o estabilizando la estructura del pseudonudo, lo que resultaría en un estancamiento prolongado de los ribosomas. Alternativamente, la merafloxacin podría estabilizar una conformación alternativa del FSE, que no favorece el cambio de marco (Sun et al., 2021)

Se han hecho estudios de sistema de cribado de alto rendimiento identificando inhibidores en el marco de lectura programado (-1PRF) para SARS-CoV-2 con un sistema de expresión sin células (CFPS) derivado de un extracto de células HeLa.

De 32,000 pocillos se encontraron dos compuestos de los cuales uno que es 6-(pyrrolidin-1-ylmethyl)phenanthridine disminuye el -1 PRF (Machida et al., 2024)

3. 3. Polimerasa de SARS-CoV-2 (complejo RdRp)

3. 3. 1. Composición: nsp12 (RdRp), nsp7 y nsp8 (auxiliares)

Los coronavirus poseen una maquinaria para realizar los procesos de replicación y transcripción. Esta maquinaria es una polimerasa dependiente de ARN o RdRp, constituida por nsp12, la subunidad catalítica, y dos subunidades accesorias, nsp7 y nsp8 (Ritesh et al., 2021; V'kovski et al., 2021).

La subunidad nsp12 (947 aminoácidos) del SARS-CoV-2 está compuesta por un dominio N-terminal de nucleotidiltransferasa asociada a RdRp de nidovirus (NiRAN, residuos D60–R249), un dominio de interfaz (residuos A250–R365) y un dominio C-terminal que contiene la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, residuos S367–F920). Este último adopta la típica conformación en forma de mano derecha observada en polimerasas de una sola subunidad, organizada en los subdominios de dedos (residuos L366-A581 y K621-G679), palma (residuos de T582-P620 y T680-Q815) y pulgar (H816-E920). Además, una horquilla β N-terminal (residuos D29–K50), se inserta en la hendidura ubicada entre el dominio NiRAN (un dominio con actividad nucleotidiltransferasa característico de los nidovirus) y la subunidad palma del propio dominio RdRp dentro de lo que será la nsp12, que sugiere un papel estructural en la estabilización del complejo. Aquí mismo se observa la presencia de iones Zn^{+2} quelados en la misma posición que en SARS-CoV cuya estructura fue estudiada a detalle previamente (Gao et al., 2020; Hillen et al., 2020).

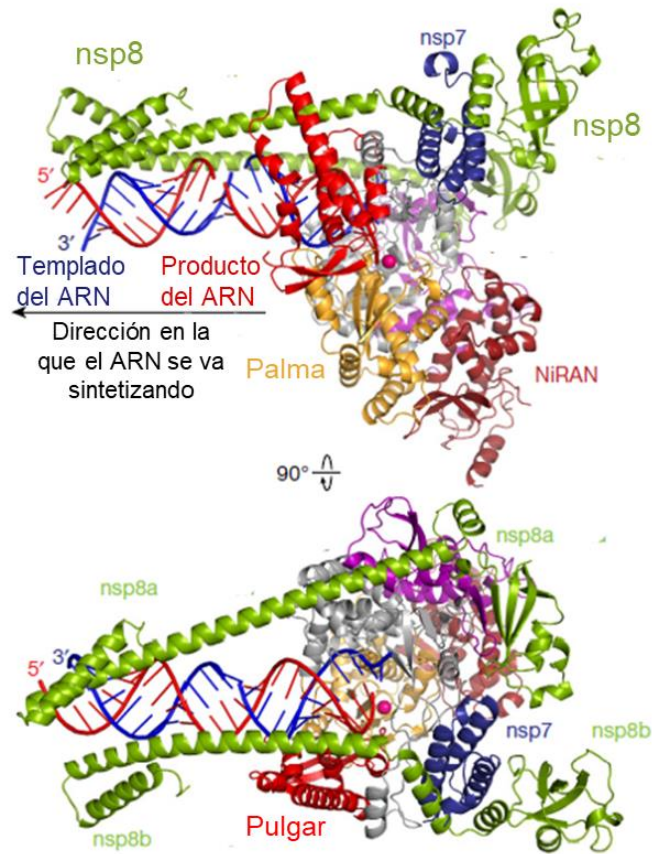


Figura 8: Estructuras del complejo de la RdRp de SARS-CoV-2 con una rotación de 90° hacia abajo. Código de colores: dominio NiRAN en guinda, interfaz en morado, dedos en gris, palma en naranja, pulgar en rojo, nsp7 en azul y nsp 8 en verde. El molde de ARN se muestra en azul y el producto de ARN en rojo. La esfera en color magenta representa un ion metálico en el sitio catalítico (Hillen et al., 2020).

Las subunidades nsp7 y nsp8 se asocian al subdominio pulgar, mientras que una copia adicional de nsp8 interactúa con el subdominio de los dedos, favoreciendo la estabilidad y eficiencia del complejo de replicación (Figura 8). Por su parte, la nsp14, mediante su actividad exonucleasa, desempeña un papel esencial en la corrección de errores, previniendo la mutagénesis letal durante la síntesis del ARN viral. La arquitectura del complejo nsp12-nsp7-nsp8 de SARS-CoV-2 es similar a la de SARS-CoV (Gao et al., 2020, 2020; Hillen et al., 2020; Ritesh et al., 2021; Zhao et al., 2021).

La nsp7 (84 aminoácidos) es una proteína de alfa hélice con un peso molecular de alrededor 10 kDa, se localiza en la membrana citoplasmática. El núcleo central consiste en un haz helicoidal N-terminal (HB) que contiene hélices HB1, HB2 y HB3 y funciona como asistente de copiado. La nsp8 (201 aminoácidos) es una proteína que posee un peso molecular de alrededor de 22 kDa, tiene 4 monómeros con diferentes conformaciones nsp8I y nsp8II. Nsp8I se describe como una estructura en forma de “palo de golf” que contiene un dominio “mango” N-terminal que puede presentar tres hélices (NH1 a 3) y un dominio de “cabeza” C-terminal. Por otro lado, nsp8 II posee un dominio de cabeza similar, pero en este caso la hélice NH3 del mango N-terminal se pliega formando dos hélices cortas. La nsp8 es capaz de sintetizar ARN desde cero con poca fidelidad a partir de ARN de una sola cadena y junto con el complejo de nsp12 puede tener la función de primasa (Arevalo et al., 2023; Ritesh et al., 2021).

Ambas proteínas pueden ensamblarse para formar una arquitectura hexadecamérica que está compuesta por 8 copias de nsp7 y 8 copias de nsp8. Estas rodean el ARN bicatenario que se está sintetizando y de esta manera favorece el avance en el complejo replicativo. Un análisis comparativo de secuencias entre SARS-CoV y SARS-CoV-2 muestra que nsp7 y nsp8 comparten el 98.8% y 97.47% de identidad respectivamente, esto podría indicar una conservación evolutiva, lo que sugiere que las funciones estructurales y catalíticas se mantienen (Arevalo et al., 2023; Ritesh et al., 2021).

En la estructura de la nsp12 en SARS-CoV-2 la ruta de entrada del molde-cebador y del nucleósido trifosfato (NTP), así como la salida de la cadena naciente son de carga positiva, se unen en una cavidad central donde los motivos conservados de la RdRp median la síntesis de ARN. Este canal de entrada para los NTP está formado por residuos hidrofílicos como K545, R553, R555 del motivo F, mientras que el ARN molde ingresa al sitio activo, que está compuesto por los motivos A y C, a través de los motivos F y G. El motivo E y el subdominio del pulgar son los que estabilizan la hebra cebadora y el producto, el molde sale por el túnel de salida de ARN. Los residuos catalíticos son los dos ácidos aspárticos D618 y D760. Junto con

los dos ácidos aspárticos anteriores, D623 y D761 también participan en el reconocimiento del trifosfato del NTP y de los cationes divalentes, respectivamente. Se ha confirmado por estructura cristalina del complejo nsp12-nsp7-nsp8 de SARS-CoV-2 que los residuos D760 y D761 están involucrados en la coordinación de dos iones Mg^{2+} , que son esenciales en el centro catalítico (Figura 9) (Gao et al., 2020; Hillen et al., 2020; Romano et al., 2020)

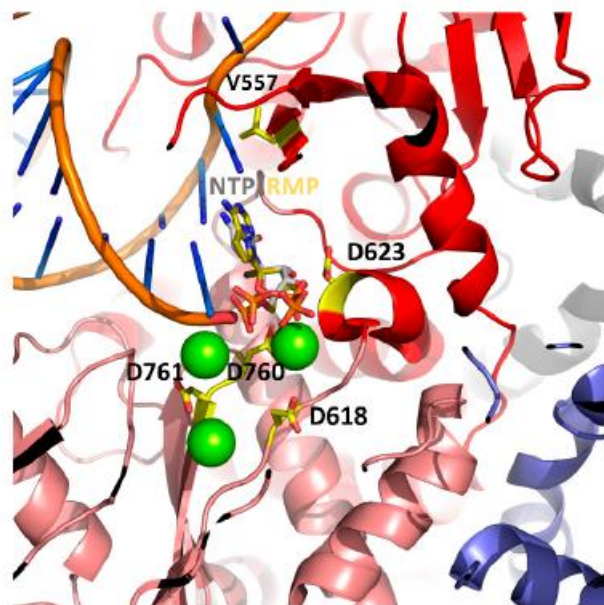


Figura 9: Imagen ampliada de nsp12 que muestra el sitio catalítico con el NTP entrante, monofosfato de Remdesivir en representación de varillas y los cationes divalentes en esferas verdes. Los residuos conservados de Asp que interaccionan directamente con el NTP y la unión al Mg^{2+} . Val557 está involucrada en la resistencia a remdesivir y se muestra en varillas amarillas (Romano et al., 2020)

3. 3. 2. Función durante la replicación y transcripción

Las proteínas nsp7 y nsp8 estimulan significativamente la actividad catalítica de nsp12. El complejo nsp12-nsp7-nsp8 es esencial para la síntesis de ARN tanto en la replicación como en la transcripción. La estructura cristalográfica de este complejo revela que el heterodímero nsp7-nsp8 (nsp8I) se ensambla sobre el

subdominio del pulgar de nsp12, orientado hacia el canal de entrada de los NTP. Simultáneamente, una segunda subunidad de nsp8 (nsp8II) interactúa con la región superior del subdominio de los dedos y con el dominio de interfaz. Estas interacciones estabilizan la estructura de nsp12 y facilitan su acoplamiento con otros componentes de la maquinaria de síntesis de ARN. Aunque su arquitectura general es similar a la del complejo de SARS-CoV, el complejo del SARS-CoV-2 presenta una eficiencia de síntesis de ARN aproximadamente un 35% menor, así como una menor termoestabilidad de nsp8 y nsp12. Estas diferencias funcionales se atribuyen a sustituciones de residuos específicas entre los dos virus. Además, el complejo muestra un mecanismo distintivo de unión al sustrato: nsp12 interactúa directamente con una vuelta de la doble hélice de ARN, mientras que nsp8 se une a otra vuelta situada a una distancia de hasta 28 pares de bases del sitio activo. Esta unión, que es independiente de la secuencia del ARN, probablemente aumenta la procesividad del complejo RdRp al anclar la plantilla y prevenir su disociación prematura (Arevalo et al., 2023; Ritesh et al., 2021)

3. 4. Variantes del virus y resistencia antiviral

SARS-CoV-2 ha experimentado múltiples mutaciones desde que emergió a finales de 2019. Estas mutaciones dieron lugar a distintas variantes, cada variante posee distintas características e implicaciones para la salud pública. Las variantes tienen diversas mutaciones en el genoma viral, principalmente en el marco de lectura de la espícula, la cual es clave para infectar la célula. Las variantes de SARS-CoV-2 representan distintas manifestaciones del virus que han emergido a lo largo del curso de la pandemia. Estas variantes pueden tener cambios genéticos que afectan su transmisibilidad, gravedad y capacidad para evadir la respuesta inmune. Variantes como Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) y Omicron (B.1.1.529) son identificadas y clasificadas por la OMS como variantes de preocupación ya que se transmiten fácilmente, tienen una mayor virulencia o la capacidad de escapar a anticuerpos neutralizantes. La variante Alfa (B.1.1.7) fue la primera en ser identificada en el Reino Unido en septiembre del 2020. Esta variante

demostró un incremento en la transmisión de variantes anteriores y estudios epidemiológicos mencionan que esta variante pudo ser más transmisible que la original de SARS-CoV-2 (Alhamlan & Al-Qahtani, 2025; Khor, 2025; Markov et al., 2023).

Las variantes Beta (B.1.351) y Gamma (P.1) del SARS-CoV-2, identificadas por primera vez en Sudáfrica en mayo de 2020 y Brasil en noviembre de 2020, respectivamente, fueron clasificadas como variantes de preocupación debido a su mayor transmisibilidad y capacidad de evasión inmunitaria. Ambas comparten mutaciones clave en la proteína S, como N501Y (al igual que en la variante Alfa), que incrementa la afinidad de unión al receptor ACE2, y E484K, fuertemente asociada con escape inmunitario y reducción de la neutralización por anticuerpos. La variante Beta presenta además la mutación K417N y la Gamma, K417T, ambas vinculadas a menor eficacia de anticuerpos monoclonales y a un aumento del riesgo de reinfección. Aunque no mostraron una virulencia marcadamente superior a la de Delta, sus propiedades de evasión inmunitaria prolongaron la transmisión y, en contextos con recursos sanitarios limitados, se asociaron con incrementos en hospitalizaciones y mortalidad (Alhamlan & Al-Qahtani, 2025; Tsagkli et al., 2024).

La variante Delta (B.1.617.2) fue identificada en India en octubre de 2020 y reconocida como una variante de preocupación (VOC) en mayo de 2021 a nivel mundial. Esta variante reemplazó rápidamente a las VOC anteriores y provocó un aumento drástico de casos en todo el mundo. Tuvo una ventaja de crecimiento significativamente mayor en comparación con las variantes anteriores debido a su alta transmisibilidad, estimando un 60% mayor que la variante Alfa. Presenta mutaciones en la proteína S: L452R, T478K y P681R que tienen un aumento en la afinidad por el receptor ACE2, favorecen la evasión en el sistema inmune y mejoran la entrada del virus a la célula. Esto llevó consigo a cargas virales más altas, mayor virulencia, incremento en las hospitalizaciones y un mayor riesgo a una enfermedad grave, principalmente en personas no vacunadas (Alhamlan & Al-Qahtani, 2025; Markov et al., 2023; Tsagkli et al., 2024).

El descubrimiento de Ómicron (B.1.1.529) en noviembre de 2021, identificada en Sudáfrica marcó el inicio de una nueva fase de la pandemia. Fue clasificada rápidamente como variante de preocupación debido a su elevado número de mutaciones y su rápida propagación. Presenta un aumento en su transmisibilidad en comparación con variantes previas, superando a la variante Delta. Esta variante acumula más de 30 mutaciones en la proteína S, principalmente en el dominio de unión al receptor (RBD), el cual, favorece la unión con el receptor ACE2 y con la evasión del sistema inmune, causando reducciones significativas en los títulos de neutralización de suero en individuos que hayan sido vacunados. Inicialmente, Ómicron se diversificó principalmente en cinco subvariantes (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5) que muestran perfiles mutacionales que influyen en la capacidad de diseminación y escape del sistema inmunitario. BA.5 se destaca como dominante a nivel global a partir de mediados de 2022 (Alhamlan & Al-Qahtani, 2025; Chaguza et al., 2023).

Desde entonces, han surgido distintas subvariantes recombinantes de Ómicron como XBB y sus descendientes (XBB.1.5 “Kraken” y XBB.1.16 “Arcturus”) que combinan la elevada transmisibilidad con la resistencia parcial a los anticuerpos neutralizantes. Además, se ha observado que Ómicron y sus subvariantes recombinantes exhiben una evolución adaptativa, lo que indica un aumento en su capacidad de transmisión en poblaciones inmunizadas. Algunos estudios sugieren que se tiene una menor gravedad clínica con esta variante y es posiblemente debido a cambios en el tropismo viral que favorece la infección en el tracto respiratorio superior sobre el inferior. La aparición de estas variantes destaca la importancia de la vigilancia genómica continua y la adaptación de las estrategias de prevención y tratamiento para hacer frente a la evolución del virus (Markov et al., 2023; Tsagkli et al., 2024)

3. 5. Antivirales

3. 5. 1. Mecanismos de acción de antivirales actuales

A comienzos de la pandemia causada por SARS-CoV-2 el descubrimiento de fármacos que ayudaran en la infección causada por este coronavirus fue un proceso lento ya que los ensayos clínicos son procesos largos y la diseminación del virus fue rápida, principalmente en etapas tempranas de la pandemia. La cristalografía de rayos X y la microscopía crioelectrónica facilitó la caracterización de estructuras clave en proteínas y enzimas de SARS-CoV-2 que ayudaron a utilizarlos como blancos terapéuticos (Saravolatz et al., 2022; Tao et al., 2021).

Molnupiravir EIDD-2801 (Figura 10), es un fármaco con una actividad antiviral como nucleósido análogo de la citidina. Su nombre químico es β -D-N⁴-hidroxicitidina (NHC), el cual es tomado por las células y fosforilado para que forme un ribonucleósido trifosfato activo (NHC-TP). Este NHC-TP es incorporado en el ARN de SARS-CoV-2 gracias a la polimerasa dependiente de ARN causando una acumulación de mutaciones en el genoma viral, de tal manera que inhibe la replicación. NHC interactúa con el sitio activo de la RdRp de SARS-CoV-2 que va desde el residuo L545 al R555. L545 forma un puente de hidrógeno con el átomo de nitrógeno de la pirimidina, mientras que R555 forma enlaces de hidrógeno con un átomo de oxígeno de NHC. NHC puede ser metabolizado a desoxiNHC que causa mutaciones en el ADN de las células hospederas. Tiene espectro amplio de actividad antiviral contra SARS-CoV y MERS-CoV en ensayos en cultivo celular. Molnupiravir es activo contra SARS-CoV-2 con una concentración efectiva del 50% (EC50), tienen un rango de 0.67 y 2.66 μ M. No se tiene evidencia de antagonismo al ser usado con Remdesivir. Este fármaco es administrado por vía oral en cápsulas de 200 mg, la dosis autorizada es de 800 mg (4 cápsulas) cada 12 horas durante 5 días. No tiene interacciones con otros medicamentos y está autorizado en pacientes mayores de 18 años y no se recomienda en pacientes embarazadas (Chan et al., 2024; Lopez et al., 2024; Saravolatz et al., 2022; Tao et al., 2021)

Remdesivir GS-441524 (Figura 10) fue el primer fármaco aprobado por la FDA en la pandemia para pacientes con COVID-19. Este es un fármaco análogo nucleósido

de la adenina, gracias a que tiene un grupo fosfato se puede metabolizar eficientemente hacia su forma activa, la cual es remdesivir-trifosfato, posee dos mecanismos de acción diferentes. El primer mecanismo de remdesivir-trifosfato se incorpora en el ARN que se está sintetizando, lo cual provoca una barrera de translocación el cual provoca que el proceso se detenga después de la adición de tres nucleótidos, desde donde remdesivir fue incorporado. Este mecanismo le permite evitar la corrección de la exonucleasa de SARS-CoV-2. Altas concentraciones de trifosfato de ribonucleósido (NTP) contrarrestan la terminación retardada de la cadena, manteniendo RDV en la plantilla de ARN. Este efecto se debe a un choque estérico con el residuo S861 de nsp12. Mutaciones en S861 pueden modificar esta interacción e inhibir este mismo mecanismo. El segundo mecanismo sucede cuando altas concentraciones de NTP al momento que el remdesivir-trifosfato se mantiene en la plantilla de ARN surge un problema estérico que es causado por el residuo V577 en la nsp12 cuando el trifosfato de uridina (UTP) se incorpora frente al remdesivir en la plantilla lo que conducirá a la inhibición. Remdesivir tiene un amplio espectro de acción contra coronavirus como MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2, posee una EC_{50} por debajo de 1 μ M. Se administra por vía intravenosa en dosis de 200 mg, seguidos por 100 mg diarios por 5 a 10 días. Se ha demostrado que disminuye el tiempo de recuperación en pacientes hospitalizados en un 87% con infección en el tracto respiratorio inferior que requerían oxigenación suplementaria (Chan et al., 2024; Lopez et al., 2024; Tao et al., 2021).

Favipiravir T-705 (Figura 10) es un análogo de purina que es ribosilada y fosforilada de manera intracelular para formar el metabolito ribofuranosyl-5'-trifosfato (T-705-RTP) a través de la ribosilación y la fosforilación. El metabolito se incorpora al sitio activo de la RdRp de SARS-CoV-2 donde es confundido con una purina. Su mecanismo de acción funciona tanto como terminador de la cadena de ARN que se está sintetizando como produciendo mutagénesis en la cadena naciente induciéndose tanto como citocina para adenina, como guanina para adenina. Interactúa con la nsp12 en el residuo L545 que forma puentes de hidrógeno con el átomo de nitrógeno en el anillo de pirazina o dona el átomo de flúor de favipiravir

RTP. De igual manera, el residuo N691 de la nsp12 forma un enlace de hidrógeno con el grupo 2'-hidroxilo de favipiravir RTP. El papel de L545 y N691 es importante, ya que mutaciones en estos residuos podrían interrumpir el enlace por puentes de hidrógeno, disminuyendo la susceptibilidad al fármaco. Su actividad in vitro contra SARS-CoV-2 muestra una EC50 en el rango de 60 a 100 μ M, necesitando una mayor concentración de antiviral para llegar a una respuesta efectiva. Es un fármaco que se administra por vía oral en pacientes mayores de 18 años, en dosis de 1600 mg durante dos veces al día el primer día, seguido de 600 mg dos veces al día a partir del segundo día durante 10 a 14 días (Chan et al., 2024; Lopez et al., 2024; Manabe et al., 2021; Tao et al., 2021)

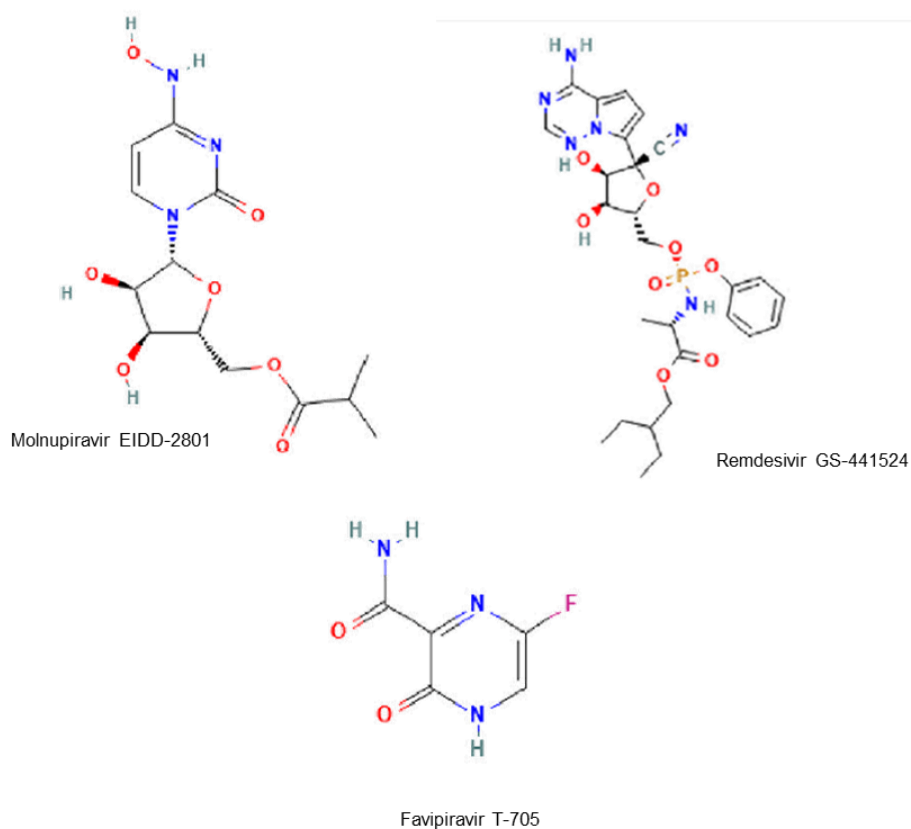


Figura 10: Estructura química de Molnupiravir, Remdesivir y Favipiravir (Kandwal & Fayne, 2023)

3. 5. 2. Mutaciones en la RdRp asociadas a resistencia (remdesivir, molnupiravir y favipiravir)

Los fármacos remdesivir y molnupiravir han sido aprobados por la FDA y otras agencias nacionales como la COFEPRIS para el tratamiento de la COVID-19. Aunque son fármacos que han hecho evidente su utilidad en el tratamiento de COVID-19, se han encontrado diversas mutaciones asociadas con estos antivirales. Favipiravir, por su parte, aunque no ha sido autorizado por la FDA, hay varios países que autorizaron su uso para COVID-19, tales como Japón, Rusia, Arabia Saudita, Tailandia y Turquía (Bahar et al., 2024).

Se ha demostrado que SARS-CoV-2 puede adquirir resistencia al antiviral remdesivir con mutaciones en la ARN polimerasa dependiente de ARN. Después de distintos pasajes con remdesivir se identificaron mutaciones las cuales son no sinónimas como V166A, N198S, S759A, V921I y C799F/R. Las combinaciones con S759A y V921I van a conferir una mayor resistencia con un incremento de hasta incluso 38 veces en la EC₅₀. La mutación con S759A disminuye la afinidad de remdesivir con la polimerasa y V921I reduce la inhibición a la cadena de ARN (Stevens et al., 2022).

Se identificaron mutaciones en la nsp12 que pueden estar asociadas con resistencia a remdesivir en pacientes con este tratamiento. La mutación E802D fue reportada en un paciente inmunocomprometido después de siete días en terapia con el fármaco. Mostró una IC₅₀ elevada en comparación con la variante original de 4.2 μ M vs 0.7 μ M, respectivamente (Gandhi et al., 2022).

En un estudio se analizaron más de cinco millones de secuencias de SARS-CoV-2 descargadas de la plataforma de GISAID para encontrar posibles mutaciones asociadas con resistencia a remdesivir, durante los primeros 18 meses de pandemia. Los autores reportan niveles bajos de mutaciones de escape. Los hallazgos sugieren que las variantes resistentes a remdesivir presentan una pobre capacidad de adaptación viral, limitando la propagación en la población (Focosi et al., 2022).

Se ha examinado el impacto de molnupiravir con la evolución de SARS-CoV-2 en más de 13 millones de secuencias que se encuentran en GISAID. Se ha mostrado que pacientes que han sido tratados con molnupiravir y que no eliminan completamente el virus tienen el potencial de transmitir SARS-CoV-2 con mutaciones características inducidas por el fármaco. Los investigadores han identificado un patrón característico de mutaciones de transición de G→A y C→U en secuencias de pacientes que han sido tratados con molnupiravir (Figura 11). Algunas de las variantes analizadas mostraron circulación limitada, por lo tanto, el estudio resalta que algunas si se pudieron propagar en la comunidad. Lo que plantea la interrogante del riesgo de que el uso extensivo del antiviral pueda contribuir a la diversificación en el genoma del virus (Sanderson et al., 2023).

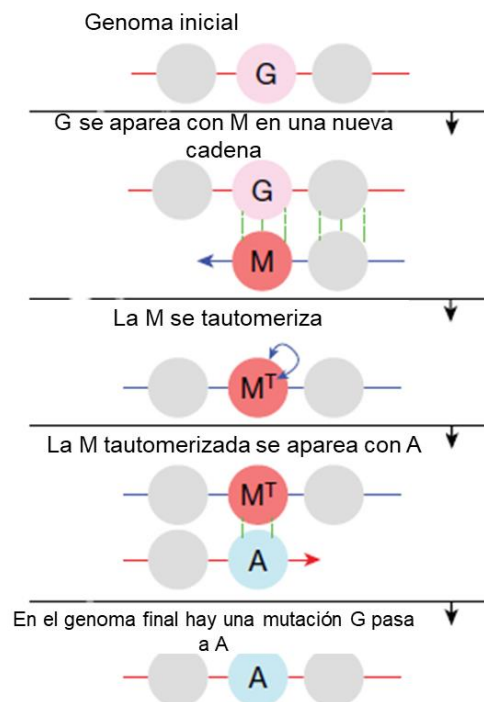


Figura 11: Molnupiravir se incorpora en su forma N-hidroxilamina frente a una Guanina. Posteriormente, puede tautomerizarse a una forma oximada, la cual se aparea con una Adenina en la replicación subsecuente, generando una mutación de guanina a adenina (Sanderson et al., 2023).

Se ha reportado la aparición de la mutación A716V en la RdRp de SARS-CoV-2 en algunos pacientes. Aún no se reconoce a una mutación de molnupiravir como tal, pero está muy cerca del sitio catalítico. Sin embargo, hasta el momento no se ha comprobado que esta variante confiera resistencia viral por lo que el impacto clínico aún se desconoce (Standing et al., 2024)

Se ha evaluado la resistencia a favipiravir mediante un análisis de resistance mutation scan en el entorno MOE, lo cual generó 350 variantes de mutantes del complejo favipiravir-nsp12. El estudio identificó 13 mutaciones con posible resistencia destacando tres mutaciones (C622R, T680K y T680S) por presentar una mayor afinidad alterada. De igual manera, las mutaciones D623A y D623G son de gran interés ya que fueron predichas como mutaciones resistentes tanto en el modelo que es basado en MOE como el método de diseño estructural de Rosetta (Padhi et al., 2021).

4. JUSTIFICACIÓN

La pandemia causada por SARS-CoV-2 ha destacado la importancia de desarrollar terapias antivirales efectivas. Aunque se han desarrollado inhibidores virales como nirmatrelvir, molnupiravir o remdesivir para tratar la infección por este virus, es esencial considerar sus desventajas las cuales incluyen: la posibilidad de resistencia viral, efectos secundarios adversos y limitaciones en la eficacia terapéutica, especialmente en etapas avanzadas de la enfermedad. Además, algunos de estos inhibidores pueden tener un alto costo y dificultad de acceso en regiones con recursos limitados. Recientemente, se ha demostrado que pacientes que han sido tratados con molnupiravir y que no eliminan completamente el virus, tienen el potencial de transmitir virus con mutaciones cuyas características fenotípicas son impredecibles, ya que podrían ser resistentes a antivirales, cambiar sus patrones antigénicos o de patogenicidad, por lo que es importante su seguimiento y también tener opciones que no impacten demasiado en la mutagénesis del virus.

La necesidad de desarrollar nuevos antivirales es de suma importancia ya que la variabilidad genética natural del virus o inducida por vacunas o antivirales puede generar resistencia a los inhibidores actuales, como sucede con los virus de la influenza o los de la inmunodeficiencia humana (VIH). Por lo tanto, es ideal contar con múltiples opciones terapéuticas efectivas. Para el diseño y desarrollo de nuevos antivirales, contar con un modelo de polimerasa viral específico es esencial. La polimerasa viral es clave para la replicación viral y es un objetivo terapéutico importante. Un modelo de polimerasa de SARS-CoV-2 permitirá investigar y diseñar inhibidores específicos que sean más efectivos y con menos posibilidades de resistencia. Esto podría conducir a tratamientos antivirales más eficaces y duraderos.

5. OBJETIVOS

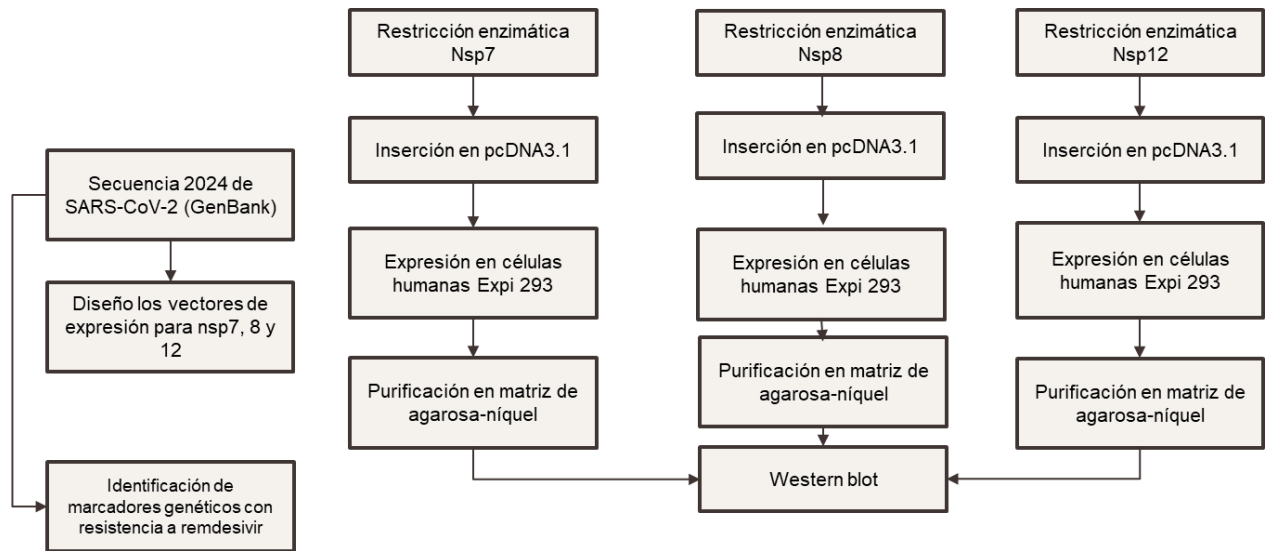
5. 1. Objetivo general

Desarrollar un sistema para la expresión de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12, constituyentes de la ARN polimerasa dependiente de ARN de SARS-CoV-2 y estudiar los elementos genómicos clave del virus que están relacionados con la resistencia y el desarrollo de antivirales con herramientas bioinformáticas.

5. 2. Objetivos específicos

- Analizar la conservación y la estructura del elemento estimulador del cambio de marco de lectura (FSE) en SARS-CoV-2 y otros betacoronavirus.
- Identificar marcadores genéticos de resistencia a remdesivir en secuencias de SARS-CoV-2.
- Producir plásmidos de expresión para las proteínas no estructurales 7, 8 y 12 del complejo de ARN polimerasa viral de SARS-CoV-2.
- Expresar las proteínas no estructurales 7, 8 y 12 en cultivo de células humanas.
- Purificar las proteínas no estructurales 7, 8 y 12 mediante cromatografía de afinidad.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. MÉTODOS

7. 1. Análisis de la conservación del FSE en betacoronavirus

Se descargaron 600 secuencias de MERS-CoV, 20 de SARS-CoV y 600 de SARS-CoV-2 en la base de datos GenBank (NCBI) en formato FASTA. La menor cantidad de secuencias de SARS-CoV se debió a su baja representatividad en el banco de genes. Las secuencias obtenidas se procesaron en el programa R mediante el paquete Biostrings, con el cual se extrajo la región genómica correspondiente al FSE de cada uno de los betacoronavirus. Posteriormente, las secuencias recortadas se alinearon en el programa Bioedit para el análisis comparativo a partir de la secuencia consenso de los betacoronavirus.

7. 2. Predicción y visualización de la estructura secundaria del FSE en SARS-CoV-2

Para la predicción de la estructura secundaria a partir de la secuencia consenso de SARS-CoV-2, se emplearon herramientas computacionales como RNAfold Web server y X3DNA DSSR para predecir estructuras secundarias, las cuales permitieron estimar configuraciones estructurales en base en modelos termodinámicos y análisis de geometría del ARN, respectivamente. En ambas plataformas se formó un código estructural compuesto de corchetes, paréntesis y puntos, que representan la formación de apareamientos, bucles y tallos en la molécula que fue analizada. Este código fue utilizado para la visualización gráfica de las estructuras de ARN mediante el programa VARNA, donde se cargó la secuencia original del FSE de SARS-CoV-2 y se obtuvo una representación visual de la estructura secundaria de este mismo.

7. 3. Dinámica molecular del FSE en SARS-CoV-2

Para evidenciar la estabilidad y la dinámica de la estructura tridimensional del FSE a través del tiempo, la estructura FSE de SARS-CoV-2 se preparó mediante el programa CHARMM-GUI y se simuló en GROMACS 2024, mediante el campo de fuerza CHARMM36m y el modelo de agua TIP3P. Estos experimentos *in silico* se realizaron en condiciones de solvatación explícita durante 100 nanosegundos. Las visualizaciones y análisis estructurales se realizaron en el programa UCSF ChimeraX.

7. 4. Identificación de marcadores genéticos con resistencia a remdesivir

Para la identificación de marcadores genéticos asociados a resistencia a remdesivir, se descargaron secuencias de aminoácidos del ORF1ab de SARS-CoV-2 en la base de datos de NCBI Virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/vssi>), donde se consideraron las siguientes condiciones: regiones geográficas de América del Norte (Canadá y México), Centroamérica y América del Sur, hospedero humano, tipo de muestra orofaríngea y secuencias comprendidas entre el 1 de mayo de 2020 y el 31 de diciembre de 2024. Las secuencias correspondientes a Estados Unidos de América no se incluyeron de manera transitoria en esta fase del análisis debido tanto a su sobrerrepresentación en la base de datos como a limitaciones actuales de capacidad de análisis computacional; no obstante, su inclusión se contempla en una etapa posterior del estudio. Posteriormente, se filtraron las secuencias correspondientes con el nombre con “ORF1ab polyprotein” y se seleccionó la región comprendida entre los aminoácidos 4350 a 5400, donde se encuentra el marco de lectura de la nsp12. El análisis en R se llevó a cabo con la identificación de posibles marcadores de resistencia, tomando como referencia la segunda metionina de la región antes mencionada como punto de inicio. Los marcadores obtenidos se organizaron en la Tabla 14, la cual se presenta en la sección de Resultados.

7. 5. Diseño los vectores para la expresión de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12

Para el diseño de vectores de expresión se analizaron y descargaron secuencias de nucleótidos de SARS-CoV-2 correspondientes a la variante Omicron JN.1 identificadas en 2024, con el fin de seleccionar los marcos de lectura de nsp7, nsp8 y nsp12. Las secuencias se sometieron a un proceso de optimización de codones para expresión en células eucariotas empleando la herramienta en línea de VectorBuilder Codon Optimization Tool. Como vector base se utilizó el plásmido pCIN3.1 (Solares-Tlapechco, 2011), el cuál deriva del vector pcDNA3.1 y contiene el marco de lectura de la proteína de la cápside (C) del virus de la hepatitis C. En el extremo 5' se introdujo un sitio para la enzima de restricción *Bam*HI (GGA TCC), seguido por la secuencia Kozak (GCC ACC ATG G) para mejorar la eficiencia en el proceso de traducción, así como una secuencia de péptido señal para su exportación al medio (ATG GGC TGG AGC TGT ATC ATC CTG TTT CTG GTG GCC ACA GCC ACA GGC GTG CAC AGC). Posteriormente, se insertaron los marcos de lectura optimizados de nsp12, nsp8 y nsp7, seguidos de una etiqueta de hexahistidina (6XHis; CATCATCACCATCACCAT) para la purificación por afinidad. Finalmente, se adicionó el codón de paro (TGA) y un sitio para la enzima de restricción *Xho*I (CTC GAG) para completar el diseño del vector de expresión para las tres proteínas.

7. 6. Preparación de células competentes

Se cultivaron 500 µl de células *E.coli* Top10 en 5 ml de medio líquido LB durante 3 horas a 37°C a 200 rpm, hasta que alcanzó una densidad óptica entre 0.5 y 0.7. Se centrifugaron alícuotas sucesivas de un volumen total de 5 ml del cultivo en tubos de fondo cónico de 1.5 ml a 4000 rpm y 4 °C durante 10 min. Tras cada centrifugación, se desechó el sobrenadante y se añadió una nueva alícuota hasta procesar el volumen total y obtener un sedimento de células bacterianas. El sedimento se lavó con 350 µl de CaCl₂ 0.1 M frío y se incubó en hielo durante 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Se desechó

el sobrenadante y se suspendió la pastilla de células bacterianas en 100 µl de CaCl₂ al 0.1M.

7. 7. Transformación con células competentes por choque térmico

A un tubo con 100 µl de células competentes se adicionaron 2 µl de plásmido incorporándolo suavemente con la punta, la reacción se incubó en hielo durante 15 minutos. Posteriormente, se dio choque térmico a 42°C durante 1 minuto y medio, inmediatamente se transfirió la reacción a hielo durante 3 minutos. La reacción se agregó a 5 ml de medio líquido LB (sin antibiótico) y se incubó 1 h a 37°C y 200 rpm, posteriormente, se centrifugó el cultivo durante 5 minutos a 4000 rpm y 4°C eliminando el sobrenadante hasta acabar con los 5 ml de cultivo y formar una pastilla de células bacterianas. La pastilla formada se suspendió en 30 µl de medio líquido LB con 5 µl de ampicilina 100 µg/ml y se sembró en placas con medio LB con agar y ampicilina 100 µg/ml. La placa se dejó en incubación a 37°C durante 16 a 18 horas, se tomó una colonia de la placa con crecimiento y se sembró en tubo LB con 5 µl ampicilina 100 µg/ml, se dejó en incubación durante 16 a 18 horas a 200 rpm y 37°C.

7. 8. Extracción de plásmido por el método STET

El cultivo de *E. coli* se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C hasta formar una pastilla de células bacterianas ya transformadas. Se lavó la pastilla con 350 µl de STET (sacarosa 8 %, Tritón X-100 5 %, EDTA 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0) y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto, se desechó el sobrenadante y se suspendió la pastilla en 350 µl de STET. Se adicionaron 25 µl de lisozima (2 mg/ml) se mezcló y se incubó a 37°C por 1 minuto, se inactivó la lisozima por ebullición durante 1 minuto. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo estéril de 1.5 ml de punta cónica y se adicionaron 2 µl de RNasa durante 30 minutos. Se agregaron 75 µl de acetato de sodio 3M y 250 µl de isopropanol, se dejó en incubación en hielo durante 1 hora y se centrifugó a

12,000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 300 µl de etanol al 70% (frío), se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos.

Finalmente, se desechó el sobrenadante y se disolvió el sedimento con 50 µl de agua libre de nucleasas.

7. 9. Preparación de gel de agarosa para electroforesis al 1%

Los marcos de lectura de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12 insertados en el plásmido pUC57 se obtuvieron de la compañía GenScript Biotech. Los plásmidos fueron nombrados pUCNSP7, pUCNSP8 y pUCNSP12. Para visualizar el fragmento se preparó un gel de agarosa al 1% m/v en amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0), calentando hasta disolver, después se dejó enfriar por 15 minutos para agregar 0.3 µl de SYBR Safe (Invitrogen), antes de verter en el molde con peine de 6 pocillos. Después de que se solidificó el gel durante 30 minutos se colocaron las muestras en dilución 1:6 con solución de carga 6X (0.25 % azul de bromofenol y 30 % glicerol). La electroforesis se corrió a 100 V durante 50 minutos.

7. 10. Digestión enzimática y clonación de los marcos de lectura de nsp7, nsp8 y nsp12 en pcDNA3.1

7. 10. 1. Digestión de plásmido pcDNA3.1

La digestión del vector pcDNA3.1, obtenido a partir del plásmido pCIN3.1, se llevó a cabo en un tubo de 1.5 ml utilizando el sistema FastDigest (Thermo Fisher Scientific) con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I. Los componentes y volúmenes de la reacción se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Componentes con sus respectivos volúmenes para restricción enzimática de pCIN3.1 utilizando como enzimas *Bam*HI y *Xho*I.

Componente	Volumen
Green Buffer	10 µl
Plásmido pCIN3.1	10 µl
<i>Bam</i> HI	5 µl
<i>Xho</i> I	5 µl
Agua libre de nucleasas	20 µl
Total	50 µl

La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 1.5 h con agitación a 300 rpm. Posteriormente, los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, cargando 4 µl de marcador de peso molecular de 1 kb. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 50 min. El fragmento correspondiente al vector linealizado se recuperó mediante purificación en gel utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) para su posterior uso en reacciones de ligación.

7. 10. 2. Digestión de los plásmidos *pUCNSP7* y *pUCNSP8*

Los plásmidos *pUCNSP7* y *pUCNSP8* se digirieron por separado en tubos de 1.5 ml empleando el sistema FastDigest con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I, de acuerdo con los volúmenes indicados en la Tabla 2.

Tabla 2: Componentes con sus respectivos volúmenes para restricción enzimática de *pUCNSP7* y *pUCNSP8* utilizando como enzimas *Bam*HI y *Xho*I.

Componente	Volumen
Green Buffer	10 ul
Plásmido <i>pUCNSP7</i> o <i>pUCNSP8</i>	10 ul
<i>Bam</i> HI	5 ul

<i>Xho</i>I	5 ul
Agua libre de nucleasas	20 ul
Total	50 ul

Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 1.5 h con agitación a 300 rpm. Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, utilizando un marcador de peso molecular de 1 kb y condiciones de corrida de 100 V durante 50 min. Los fragmentos correspondientes a los marcos de lectura de nsp7 y nsp8 se purificaron a partir del gel mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit y se destinaron a su posterior ligación en el vector pcDNA3.1.

7. 10. 3. Amplificación de marco de lectura de nsp12 por PCR

El marco de lectura de nsp12 se amplificó a partir del plásmido pUCNSP12 mediante PCR, utilizando la enzima MegaFi Pro Fidelity DNA Polymerase (Applied Biological Materials Inc.). La mezcla de reacción se preparó sobre hielo conforme a los componentes y volúmenes descritos en la Tabla 3.

Tabla 3: Componentes con sus respectivos volúmenes para reacción de PCR de pUCNSP12 utilizando MegaFi Pro Fidelity DNA Polymerase.

Componente	Volumen
2X MegaFI Pro Reaction Buffer	12.5 µl
dNTP Mix (10 mM)	0.5 µl
M13 sentido (10 uM)	1 µl
M13 antisentido (10 uM)	1 µl
Plantilla de ADN	100 ng de DNA genómico
MegaFi Pro Fidelity DNA Polymerase	0.5 µl
Agua libre de nucleasas	Llevar a 25 µl

Total	25 µl
--------------	-------

Se emplearon los oligonucleótidos universales M13 forward (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') y M13 reverse (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'). La reacción se homogenizó suavemente, se centrifugó brevemente y se sometió a amplificación en un termociclador bajo condiciones estándar para un fragmento de aproximadamente 1 kb, según lo descrito en la Tabla 4 el termociclador. Se usaron condiciones para una PCR estándar (1kb de molde) (Applied Biological Materials Inc, 2016).

Tabla 4: Pasos, temperaturas y tiempo de los ciclos correspondientes a la PCR utilizando MegaFi Pro Fidelity DNA Polymerase.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	95°C	5 minutos
25 – 35 ciclos	95°C	15 segundos
	50-70°C	15 segundos
	72°C	20 – 30 segundos/kb ²
Extensión Final	72°C	5 minutos

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El fragmento correspondiente al marco de lectura de nsp12 se recuperó mediante purificación en gel utilizando el sistema QIAquick Gel Extraction Kit.

7. 10. 4. Digestión del fragmento amplificado de nsp12

El fragmento de PCR correspondiente al marco de lectura de nsp12 se sometió a digestión con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I utilizando el sistema FastDigest. La reacción se preparó en un tubo de 1.5 ml de acuerdo con lo indicado en la Tabla 5 y se incubó a 37 °C durante 1.5 h con agitación a 300 rpm.

Tabla 5: Componentes con sus respectivos volúmenes para restricción enzimática del fragmento de PCR de pUCNPS12 utilizando *Bam*HI y *Xho*I.

Componente	Volumen
Green Buffer	10 µl
Fragmento de marco de lectura de nsp12 extraído de pUCNSP12	10 µl
<i>Bam</i> HI	5 µl
<i>Xho</i> I	5 µl
Agua libre de nucleasas	20 µl
Total	50 µl

Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, utilizando un marcador de peso molecular de 1 kb. El fragmento digerido se purificó mediante el QIAquick Gel Extraction Kit para su posterior clonación en pcDNA3.1.

7. 10. 5. Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa

Los fragmentos correspondientes a los marcos de lectura de nsp7, nsp8 y nsp12 se excisaron del gel de agarosa con un bisturí estéril y se purificaron siguiendo las instrucciones del QIAquick Gel Extraction Kit. De manera resumida, el gel se disolvió mediante incubación con amortiguador QG a 50 °C, seguido de la aplicación de la muestra a una columna QIAquick, lavados con amortiguador PE y elución final con amortiguador EB. El ADN purificado se almacenó a -30 °C hasta su uso (QIAGEN, 2018).

7. 10. 6. Ligación de los marcos de lectura en el vector pcDNA3.1

La ligación de los fragmentos purificados en el vector pcDNA3.1 se realizó utilizando T4 ADN ligasa (Thermo Fisher Scientific), empleando una relación molar inserto:vector de 1:1 a 5:1, según lo descrito en la Tabla 6.

Tabla 6: Componentes con sus respectivos volúmenes para reacción de ligación utilizando T4 ADN Ligasa (Thermo Fisher Scientific).

Componente	Cantidad
Vector linealizado de ADN	20-100 ng
Inserto de ADN	1:1 a 5:1 de relación molar respecto al vector.
Amortiguador 10X T4 ADN Ligasa	2 μ l
T4 ADN Ligasa	1 Weiss U
Agua libre de nucleasas	Llevar a 20 μ l
Volumen total	20 μ l

La reacción se incubó a 22 °C durante 10 min. Posteriormente, se utilizaron 2 μ l de la mezcla de ligación para la transformación de células competentes mediante choque térmico, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, 2014).

7. 11. Extracción de ADN plasmídico mediante maxiprep

Una colonia bacteriana transformada con cada uno de los plásmidos pcDNSP7, pcDNSP8 y pcDNSP12 se inoculó individualmente en medio LB líquido estéril suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubó a 37 °C con agitación a 180 rpm durante 8 h. Posteriormente, se tomaron 300 μ l de cada cultivo inicial y se inocularon en 150 ml de medio LB estéril, también suplementado con ampicilina (100 μ g/ml), seguido de una incubación a 37 °C y 180 rpm durante 16–21 h. Finalizada la incubación, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 3400 $\times g$ durante 10 min para obtener el sedimento celular, descartándose el sobrenadante.

7. 11. 1. *Purificación del ADN plasmídico*

La extracción del ADN plasmídico se realizó utilizando el ZymoPURE Plasmid Maxiprep Kit (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. El sedimento bacteriano se resuspendió completamente en 14 ml de amortiguador ZymoPURE P1 (frío) mediante vórtex. A continuación, se añadieron 14 ml de amortiguador ZymoPURE P2, mezclando inmediatamente por inversión suave del tubo seis veces, y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min hasta observar una solución clara, viscosa y de coloración púrpura, indicativa de la lisis celular completa. Posteriormente, se agregaron 14 ml de amortiguador ZymoPURE P3 y se mezcló suavemente por inversión cinco veces. La neutralización se consideró completa cuando la solución adquirió una coloración amarilla y se formó un precipitado amarillento.

7. 11. 2. *Clarificación del lisado y purificación en columna*

El lisado neutralizado se transfirió a un ZymoPURE Syringe Filter-X acoplado a un tubo cónico de 50 ml y se dejó reposar durante 8 min para permitir la separación del precipitado. Transcurrido este tiempo, el lisado se filtró mediante la presión del émbolo, obteniéndose aproximadamente 35 ml de solución clarificada. Al lisado filtrado se le añadieron 14 ml de ZymoPURE Binding Buffer, mezclando por inversión suave ocho veces. Posteriormente, se retiró el reservorio superior de 50 ml de la columna Zymo-Spin V-PX y se aplicaron alícuotas de 10 ml del lisado a la columna, centrifugando a $500 \times g$ durante 2 min. El filtrado se descartó y el procedimiento se repitió hasta cargar completamente la muestra. La columna se lavó con 10 ml de ZymoPURE Wash 1, seguida de centrifugación a $500 \times g$ durante 2 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados consecutivos con 10 ml de ZymoPURE Wash 2, centrifugando en cada ocasión bajo las mismas condiciones y descartando el eluido.

7. 11. 3. *Elución del ADN plasmídico*

Una vez finalizados los lavados, se retiró el reservorio de 15 ml y la columna Zymo-Spin V-PX se colocó en un tubo cónico limpio de 50 ml para una centrifugación adicional a $16\,000 \times g$ durante 1 min, con el fin de eliminar restos de amortiguador

de lavado. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo limpio de 1.5 ml y el ADN plasmídico se eluyó mediante la adición de 400 µl de ZymoPURE Elution Buffer, aplicados directamente al centro de la matriz. Tras una incubación de 2 min a temperatura ambiente, se centrifugó a $16\,000 \times g$ durante 1 min para recuperar el ADN purificado (Zymo Research, 2023).

7. 12. Sistema de expresión Expi293

7. 12. 1. Cultivo y mantenimiento de las células Expi293

Las células Expi293 se cultivaron de acuerdo con el Manual del Sistema de Expresión Expi293 (Thermo Fisher Scientific, MAN0019402). Las células se mantuvieron en suspensión en Expi293 Expression Medium y se incubaron a 37 °C, en una atmósfera con 8 % de CO₂ y agitación constante a 125 rpm, utilizando un agitador orbital con un diámetro de órbita de 2.5 cm. Para el mantenimiento rutinario, los cultivos se subcultivaron cada tres días, asegurando que la densidad celular se mantuviera entre 3.0×10^6 y 5.0×10^6 células/ml, correspondiente a la fase logarítmica temprana de crecimiento. La viabilidad celular se evaluó mediante tinción con azul de tripano, manteniéndose por encima del 95 % previo a cualquier procedimiento de transfección. El volumen de suspensión celular requerido para cada subcultivo se calculó a partir de la densidad celular viable, utilizando las densidades de siembra recomendadas para el mantenimiento rutinario, las cuales se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Densidades de siembra recomendadas para el mantenimiento rutinario de cultivos celulares.

Momento del subcultivo	Densidad de siembra recomendada
Para células listas 3 días después del subcultivo	0.4 - 0.5 x 10 ⁶ células viables/ml
Para células listas 4 días después del subcultivo	0.3 - 0.4 x 10 ⁶ células viables/ml

Por otro lado, los volúmenes de cultivo empleados en matraces ventilados sin deflectores se ajustaron de acuerdo con el tamaño del matraz, como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8: Volúmenes recomendados para el mantenimiento rutinario de cultivos celulares en matraces ventilados sin deflectores.

Tamaño del matraz	Volumen de cultivo
125 ml	30-35 ml
250 ml	60-70 ml
500 ml	100-120 ml
1 L	220-240 ml
2 L	440-480 ml
3 L	800-1000 ml

Previo a cada subcultivo o transfección, las células se homogenizaron suavemente para asegurar una suspensión uniforme. Para la expansión celular, una alícuota del cultivo se inoculó en medio fresco previamente preacondicionado a 37 °C, ajustando la densidad inicial a 2.5-3.0 × 10⁶ células/ml. Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones estériles en gabinete de bioseguridad (Thermo Fisher Scientific, 2020).

7. 12. 2. Transfección de células Expi293

La transfección se realizó utilizando el sistema comercial Expi293 Expression System Kit (Thermo Fisher Scientific, no. de catálogo A14635), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para este procedimiento, se emplearon células en fase logarítmica temprana con una viabilidad superior al 95 %, ajustadas a una densidad de 2.5×10^6 células/ml. El ADN plasmídico de interés se diluyó en Opti-MEM I Reduced Serum Medium y se mezcló con ExpiFectamine 293 Reagent para la formación de los complejos de transfección, siguiendo las proporciones indicadas en la Tabla 9 para una reacción estándar. Ambas mezclas se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se combinaron.

Tabla 9: Componentes con sus respectivos volúmenes para llevar a cabo 1 reacción de transfección en células Expi293.

Tubo	Componente	Volumen
Tubo 1	Expifectamine 293 Reagent	81 ul
	Opti-MEM	1.5 ml
Tubo 2	ADN plasmídico	30 ug
	Opti-MEM	1.5 ml

Los complejos de transfección se añadieron al cultivo celular mediante mezcla suave, y las células se incubaron a 37 °C, con 8 % de CO₂ y agitación constante a 125 rpm. Transcurridas 16 a 21 h de la transfección, se añadieron los reactivos ExpiFectamine 293 Transfection Enhancer 1 y 2, en las cantidades indicadas en la Tabla 10, con el fin de potenciar la expresión proteica (Thermo Fisher Scientific, 2016).

Las células transfectadas se mantuvieron en cultivo durante 3–4 días postransfección, dependiendo de la cinética de expresión del vector. Finalmente, el

sobrenadante se recolectó para el análisis de expresión y la posterior purificación de las proteínas recombinantes.

Tabla 10: Componentes con sus respectivos volúmenes de los reactivos ExpiFectamine 293 Transfection Enhancer 1 y 2 necesarios para una reacción de transfección en células Expi293.

Componente	Volumen
Enhancer 1	150 ul
Enhancer 2	1.5 ml

7. 13. Purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad

La purificación de proteínas recombinantes con etiqueta de histidina (His-tag) se realizó mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC), utilizando columnas preempacadas HisTrap HP con matriz Ni Sepharose High Performance (Cytiva).

7. 13. 1. Preparación de la muestra y condiciones de trabajo

Las muestras celulares se ajustaron previamente a las condiciones del amortiguador de unión, optimizando la concentración de imidazol con el fin de minimizar la unión inespecífica de proteínas nativas y maximizar la afinidad por las proteínas con etiqueta de histidina. Antes de la carga en la columna, las muestras se filtraron a través de membranas de 0.22 μm para eliminar partículas en suspensión y evitar la obstrucción de la matriz cromatográfica (Cytiva, 2020b).

7. 13. 2. *Procedimiento de purificación*

La columna HisTrap HP (1 ml) se conectó al sistema de purificación asegurando la ausencia de burbujas de aire. Posteriormente, se equilibró con al menos 5 volúmenes de columna (CV) de amortiguador de unión, a un flujo de 1 ml/min. La muestra pretratada se cargó utilizando un sistema automatizado de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) ÄKTA (Agilent Technologies). Tras la carga, la columna se lavó con amortiguador de unión hasta alcanzar una línea de base estable a 280 nm, con el fin de eliminar proteínas no unidas. La elución de la proteína de interés se llevó a cabo empleando un gradiente lineal de amortiguador de elución, utilizando 5 CV para recuperar las proteínas afines. Todo el proceso se realizó en un sistema FPLC controlado mediante el software UNICORN, el cual permite la monitorización en tiempo real de parámetros como flujo, presión y gradiente (Cytiva, 2020a).

7. 13. 3. *Manejo y mantenimiento de la columna HisTrap HP*

Antes y después de cada corrida de purificación, la columna se sometió a protocolos de limpieza *in situ* en el sistema ÄKTA, utilizando una solución de etanol al 20 %. Para almacenamiento prolongado, las columnas se conservaron en etanol al 20 % a 4 °C, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

7. 14. **Concentración de proteínas**

Posterior a la purificación de proteínas nsp7, nps8 y nsp12 mediante cromatografía de afinidad utilizando el sistema ÄKTA, las fracciones que fueron eluidas se concentraron utilizando filtros para centrífuga Amicon Ultra-15 con un límite de corte de 10 kDa (Milipore). Este procedimiento permitió aumentar la concentración

proteica mediante la combinación de distintas fracciones, así como reducir el contenido de imidazol presente en el amortiguador de elución.

Para el intercambio de amortiguador y concentración, se añadieron 15 ml de agua bidestilada al dispositivo de ultrafiltración y se centrifugó en un rotor oscilante a $4000 \times g$ durante 10 min. Posteriormente, se repitió el procedimiento utilizando 15 ml de PBS. Finalmente, las fracciones de proteína se añadieron al dispositivo (completando el volumen final a 15 ml con PBS cuando fue necesario) y se centrifugaron nuevamente a $4000 \times g$ durante 10 min. Las muestras concentradas se almacenaron a 4°C hasta su posterior análisis (Merck Millipore Ltd, 2014).

7. 15. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo colorimétrico de Bradford en microplaca de 96 pocillos. Se preparó una curva estándar mediante diluciones seriadas 1:1 de albúmina sérica bovina (Quick Start Bovine Serum Albumin Standard BioRad; 2 mg/ml) con concentraciones finales de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 $\mu\text{g/mL}$. En cada pocillo se pipetearon 5 μL del estándar o muestra y se añadieron 250 μL de reactivo Bradford (Bio-Rad, listo para usar). Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y la absorbancia se midió en un lector de microplacas a 595 nm. La curva estándar se construyó como absorbancia en función de los μg de proteína por pocillo (μg = concentración $\times$ volumen añadido) y se ajustó mediante regresión lineal. Las concentraciones de las muestras se calcularon a partir de la ecuación de la recta obtenida. Todos los estándares y muestras se analizaron por duplicado.

7. 16. Determinación de concentración de proteínas por nanofotometría

La concentración de las muestras de nsp7, nsp8 y nsp12 se determinó mediante espectrofotometrías utilizando el equipo NanoPhotometer N60 (Implen, Inc.). El equipo se calibró previamente empleando 1 µl de PBS como blanco y la superficie de medición se limpió cuidadosamente con un paño libre de pelusa entre cada lectura. Para cada determinación, se depositó 1 µl de muestra sobre la superficie de medición y se registró la absorbancia a 280 nm. Cada muestra se midió por duplicado, calculándose la concentración final como el promedio de ambas mediciones (IMPLEN, 2012).

7. 17. Separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida

7. 17. 1. Preparación del sistema de corrida

Las placas de vidrio se limpiaron con etanol y se ensamblaron en el soporte correspondiente para la preparación de los geles. El porcentaje de acrilamida/bisacrilamida del gel separador se seleccionó en función del peso molecular de la proteína de interés, de acuerdo con los valores indicados en la Tabla 11.

Tabla 11: Porcentaje de acrilamida/bisacrilamida dependiente del peso molecular de la proteína que se busca.

Tamaño de la proteína (kD)	Porcentaje de acrilamida/bisacrilamida en el gel
<25	15%
25-50	12%
50-100	10%
>100	8%

La composición de los geles separadores para los diferentes porcentajes de acrilamida/bisacrilamida se detalla en la Tabla 12. El volumen total preparado fue suficiente para dos geles con un espaciador de 0.75 mm. Previo a la gelificación, se añadieron 50 μ l de persulfato de amonio (APS) al 10 % y 7 μ l de Tetrametiletilendiamina (TEMED), y la solución se mezcló suavemente.

Tabla 12: Componentes con sus respectivos volúmenes para la preparación del gel separador en el SDS-PAGE dependiente del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida.

Porcentaje de acrilamida/bisacrilamida en el gel	15%	12%	10%	8%
Agua (ml)	2.4	3.4	4.1	4.7
Acrilamida/Bis al 30% (ml)	5.0	4.0	3.2	2.7
Tris HCl pH 8.8 (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5
SDS al 10%	0.1	0.1	0.1	0.1
Volumen total (ml)	10	10	10	10

El gel separador se vertió entre las placas, dejando aproximadamente 2 cm libres en la parte superior para la posterior adición del gel apilador. La superficie del gel se cubrió con isopropanol para evitar deshidratación y favorecer una polimerización uniforme durante 15 min. Una vez polimerizado, el isopropanol se retiró completamente. Posteriormente, se preparó el gel concentrador (4.5 % de acrilamida/bisacrilamida), cuya composición se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13: Componentes con sus respectivos volúmenes para la preparación del gel concentrador en SDS-PAGE.

Porcentaje de acrilamida/bisacrilamida en el gel		4.5 %
Agua (ml)		5.9
Acrilamida/Bis al 30% (ml)		1.5
Tris-Hcl pH 6.8 (ml)		2.5
SDS al 10% (ml)		0.1
Volumen total (ml)		10

Antes de su vertido, se añadieron 50 µl de APS al 10 % y 13 µl de TEMED. El gel concentrador se vertió cuidadosamente sobre el gel separador y se colocó el peine evitando la formación de burbujas. La polimerización se llevó a cabo durante 20 min. Una vez polimerizados ambos geles, las placas se ensamblaron en la celda de electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad) y se añadió amortiguador de corrida en las cámaras interna y externa hasta cubrir completamente los pocillos (Hycult biotech, 2010).

7. 17. 2. *Preparación de muestras y corrida electroforética*

Las muestras de proteína se prepararon mezclando 20 µl de muestra con 3 µl de amortiguador de carga. Posteriormente, se desnaturalizaron mediante calentamiento a 95 °C durante 2 min y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 min antes de la carga. En los casos necesarios, las muestras se concentraron utilizando una centrífuga de vacío 5301 (Eppendorf) durante 15 min. Las muestras se cargaron en los pocillos del gel junto con 4 µl de marcador de peso molecular de amplio espectro (10-250 kDa, Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad). Para proteínas con un peso molecular menor a 50 kDa, la electroforesis se realizó inicialmente a 80 V durante 20 min, seguida de 100 V durante 60 min. En el caso de proteínas con un peso molecular mayor a 50 kDa, la corrida se llevó a cabo a 100 V durante los primeros 20 min, incrementando posteriormente el voltaje a 110 V durante 40 min.

7. 18. Tinción de geles con azul de Coomassie

Una vez finalizada la electroforesis, los geles de poliacrilamida se retiraron cuidadosamente de las placas de vidrio y se sometieron a tinción con azul de Coomassie Brilliant Blue R-250 para la visualización de las proteínas separadas. Los geles se incubaron en solución de tinción (0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 % metanol y 10 % ácido acético) durante 1 h con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, el exceso de colorante se eliminó mediante lavados sucesivos con solución de desteñido (40 % metanol y 10 % ácido acético), hasta obtener un fondo claro que permitiera una adecuada visualización de las bandas proteicas. El desteñido final se realizó utilizando una solución con menor concentración de metanol (10 % metanol y 10 % ácido acético) hasta lograr un contraste óptimo entre las bandas de proteína y el fondo del gel. Las bandas proteicas se documentaron mediante cámara electrónica y se compararon con el marcador de peso molecular para estimar el tamaño aparente de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12. La intensidad de las bandas se utilizó como criterio cualitativo para evaluar el nivel de expresión y la pureza de las proteínas purificadas.

7. 19. Tinción de geles con plata

Tras la electroforesis en gel de poliacrilamida, los geles se incubaron en 100 ml de solución fijadora (metanol al 40%, ácido acético al 10% en 100 ml de agua destilada) con agitación constante durante 30 min. Posteriormente, se lavaron con 100 ml de metanol al 40 % durante 10 min, seguido de un lavado con 100 ml de agua bidestilada durante 30 min, realizando cambios de agua cada 10 min bajo agitación constante. A continuación, los geles se sumergieron en 100 ml de solución de sensibilización (tiosulfato de sodio al 0.03% en 100 ml de agua destilada) durante 1 min y se lavaron tres veces con agua destilada, 1 min por lavado. Posteriormente, se incubaron en 100 ml de solución de tinción (nitrato de plata al 0.2% y formaldehído al 0.08% en 100 ml de agua destilada) previamente enfriada, durante 25 min a 4 °C. Después de la tinción, se añadieron 100 ml de solución reveladora

(carbonato de sodio al 2% y formaldehído al 0.05% en 100 ml de agua destilada) fría y se incubó el gel con agitación hasta observar un cambio de coloración de la solución a amarillo (aproximadamente 15–20 min). La solución reveladora se reemplazó por una solución fresca y se continuó la incubación hasta alcanzar la intensidad deseada de las bandas proteicas (15–17 min). Finalmente, el gel se lavó con 100 ml de agua destilada durante 20 s y la reacción se detuvo mediante la adición de 100 ml de solución de paro (ácido acético al 5% en 100 ml de agua destilada). Los geles teñidos se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

7. 20. Detección de proteínas recombinantes mediante *Western Blot*

7. 20. 1. *Transferencia de proteínas*

Una vez concluida la electroforesis en gel de poliacrilamida, el gel se equilibró en amortiguador de transferencia (agua al 70%, metanol al 20% y amortiguador de corrida al 10%; el amortiguador de corrida se preparó con Tris y glicina disueltos en 600 mL de agua, suplementado con SDS al 10%) durante 15 min. De manera paralela, la membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) se activó mediante incubación en metanol durante 15 min, mientras que dos hojas de papel filtro se humedecieron en el mismo amortiguador de transferencia durante el mismo tiempo. La transferencia de proteínas se realizó mediante un sistema de electrotransferencia semiseca (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad). Para el ensamblaje del sándwich de transferencia, se colocó una hoja de papel filtro sobre la placa inferior del sistema, eliminando el exceso de amortiguador con un rodillo. Posteriormente, se colocó la membrana de PVDF, asegurando la eliminación de burbujas de aire, seguida del gel de poliacrilamida y, finalmente, la segunda hoja de papel filtro, presionando suavemente para evitar la formación de burbujas. La electrotransferencia se llevó a cabo a 15 V, durante 30 min para proteínas con peso molecular menor a 50 kDa, y durante 20 min para proteínas con peso molecular mayor a 50 kDa.

7. 20. 2. *Bloqueo de membrana e incubación con anticuerpo anti-hexahistidina*

Tras la transferencia, la membrana se bloqueó durante 1 h con una solución de bloqueo preparada con 1.25 g de leche en polvo PreNAN, 25 ml de TBS y 250 µl de Tween 20, con el fin de reducir la unión inespecífica de anticuerpos. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con TBS. A continuación, la membrana se incubó durante 3 h con el anticuerpo HRP Anti-6×His tag, preparado en una solución que contenía 3 µl de anticuerpo, 6 ml de TBS, 72 µl de Tween 20 y 0.3 g de leche en polvo PreNAN. Al finalizar la incubación, se realizaron tres lavados con TBS para eliminar el exceso de anticuerpo (Abcam, 2002).

7. 20. 3. *Detección de proteínas*

La detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia. Para ello, se preparó la solución de trabajo del sustrato ECL Western Blotting Substrate (Promega), mezclando 2 µl de solución de peróxido y 2 µl de solución potenciadora de luminol, cantidad suficiente para cubrir completamente la membrana. La incubación se realizó durante 1 min en completa oscuridad. La señal quimioluminiscente se registró utilizando el sistema de escaneo D-Digit (LI-COR Biosciences).

8. RESULTADOS

8. 1. Análisis de la conservación del FSE en betacoronavirus

El análisis de conservación del segmento de 118 nucleótidos constituyente del FSE mostró un 100% de identidad en las secuencias dentro de cada uno de los tres betacoronavirus analizados. Mientras que la identidad nucleotídica del FSE de SARS-CoV y de SARS-CoV 2 fue del 92% de conservación, entre los tres virus, ya considerando MERS-CoV, fue de 52.42%. En la Figura 12 se pueden observar las similitudes y diferencias entre las secuencias de los tres virus.

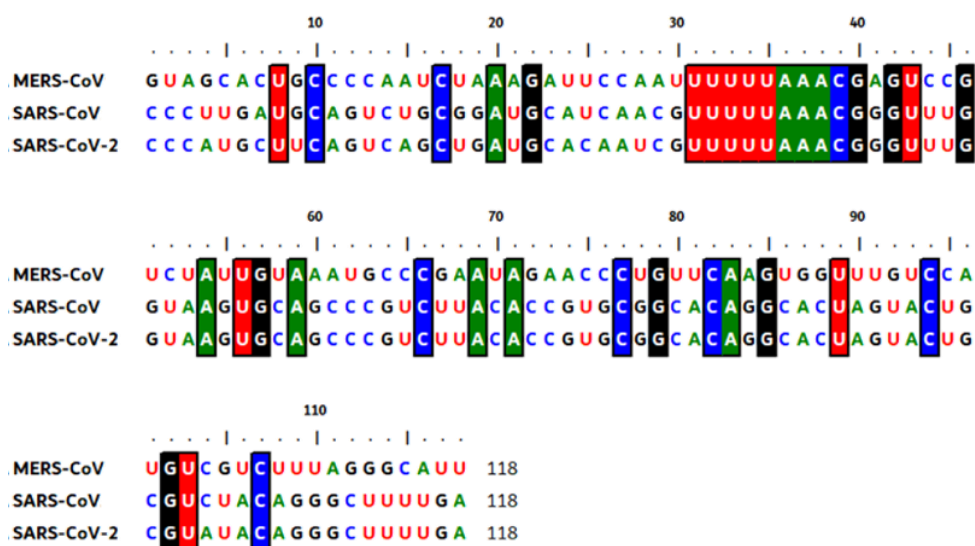


Figura 12: Alineamiento de las secuencias consenso del FSE de MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2. Se resaltan nucleótidos conservados y variaciones clave en la región de -1PRF.

8. 2. Análisis en la predicción y visualización de la estructura secundaria del FSE en SARS-CoV-2

El análisis de predicción de las estructuras secundarias en RNAFold y la visualización en Varna arrojó una estructura que contiene el FSE. En el sitio deslizando forma una pequeña horquilla, la región espaciadora no forma estructuras

secundarias y el pseudonudo de tres tallos forma estructuras de tallos y horquillas como se muestra en la Figura 13.

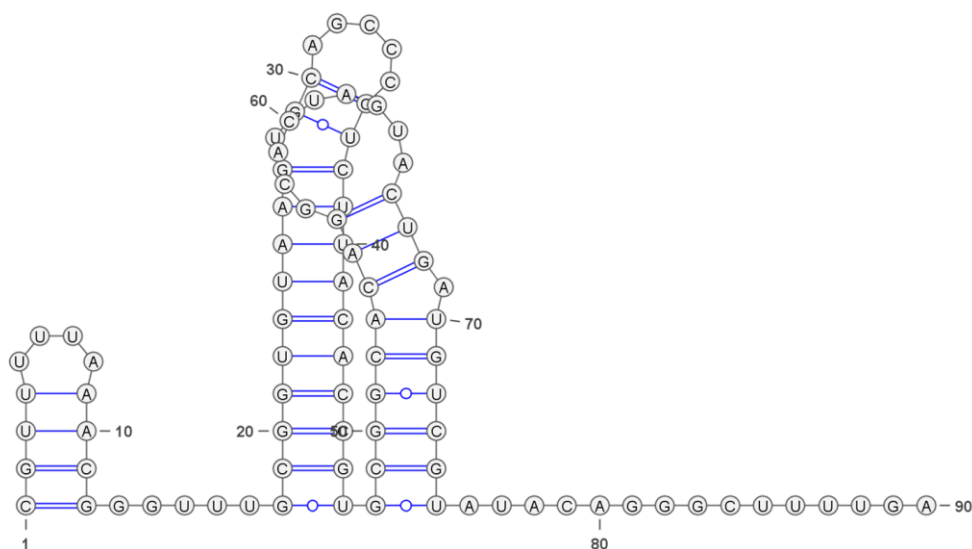


Figura 13: Predicción computacional de la estructura secundaria del FSE de SARS-CoV-2 con RNAFold y Varna.

En el caso de la predicción de estructuras secundarias con x3DNADSSR y la visualización en Varna se observa de igual manera que se genera una pequeña horquilla en el sitio deslizante, la región espaciadora se mantiene sin generar ninguna estructura secundaria y el sitio deslizante, como en la imagen anterior forma estructuras de tallos y horquillas apilados uno sobre el otro, como se muestra en la Figura 14.

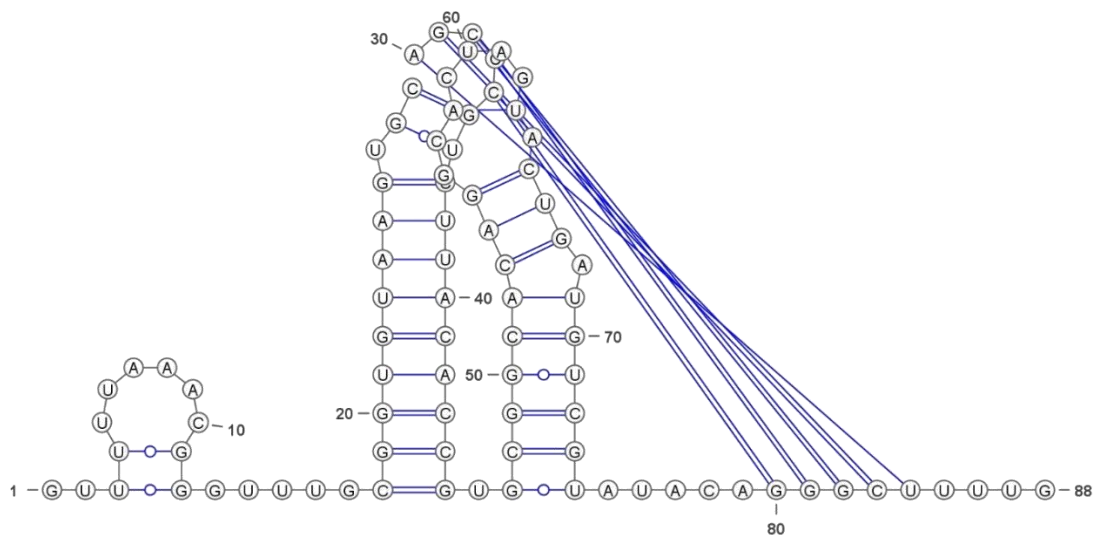


Figura 14: Predicción computacional de la estructura secundaria del FSE de SARS-CoV-2 con x3DNADSSR y Varna.

En la dinámica molecular se observó el movimiento y la estabilidad del ARN en SARS-CoV-2 en nanosegundos (ns) la estructura incluía la horquilla atenuadora, el sitio deslizante, la región espaciadora y el pseudonudo.

En el tiempo de 0 ns el pseudonudo adopta una conformación estable mediante interacciones intramoleculares entre sus bucles. La horquilla atenuadora permanece lineal y sin apareamientos internos, mientras que el sitio deslizante y la región espaciadora comienzan a establecer interacciones entre sí.

En el tiempo de 9595 ns se incrementan las interacciones de apareamiento de bases dentro del pseudonudo, lo que sugiere una estabilización adicional de su estructura. La horquilla atenuadora se mantiene lineal, mientras que el sitio deslizante comienza a aparearse internamente. La región espaciadora adopta una conformación más extendida.

En el tiempo de 13837 ns la horquilla atenuadora inicia un proceso de autoapareamiento, lo que sugiere un cambio conformacional hacia una estructura más compacta. El sitio deslizante continúa estabilizado mediante interacciones

internas, mientras que el pseudonudo se compacta aún más, reforzando su estructura mediante nuevas interacciones de bases.

En el tiempo de 15946 ns se observa una ligera distorsión en la estructura de la horquilla atenuadora, con una pérdida parcial de sus interacciones internas. El sitio deslizando mantiene un número limitado de apareamientos de bases y se conserva en una conformación lineal. El pseudonudo muestra signos de desemparejamiento parcial, aunque mantiene su estructura global relativamente compacta. Como se muestra a continuación en la Figura 15.

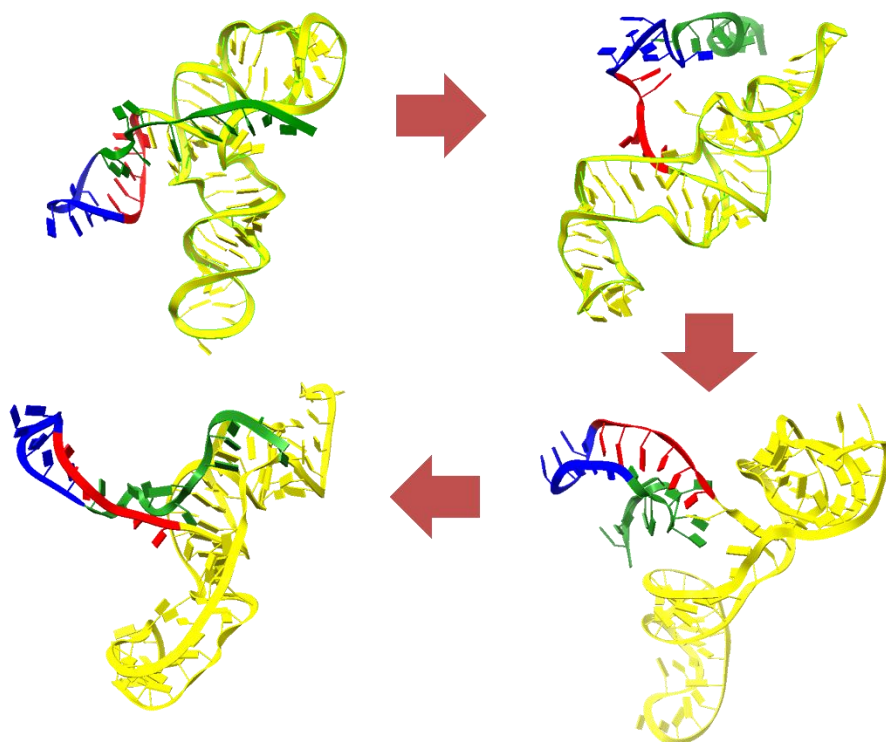


Figura 15: Simulación molecular de la estructura 3D del FSE de SARS-CoV-2. Se muestran las estructuras en los tiempos 0, 9595, 13837 y 15946 ns. Las regiones de horquilla atenuadora (verde), sitio deslizando (azul), espaciador (rojo) y pseudonudo (amarillo) se destacan para facilitar su comparación estructural.

En conjunto, el análisis de la conservación, la predicción estructural secundaria y la dinámica molecular del FSE en betacoronavirus (principalmente en SARS-CoV y SARS-CoV-2), presenta un alto grado de conservación.

Las predicciones secundarias obtenidas coincidieron con la presencia de los elementos principales del FSE como el sitio deslizante, la región espaciadora y la formación del pseudonudo con horquillas y tallos apilados uno sobre otro. Esto refuerza la confiabilidad de los modelos y la relevancia biológica que tienen.

La dinámica molecular permitió observar la estabilidad conformacional del FSE a través del tiempo, destacando el papel del pseudonudo de tres tallos como elemento estructuralmente estable, reforzando las interacciones intramoleculares en la simulación. Los cambios conformacionales que se observaron en la horquilla atenuadora y el sitio deslizante sugieren flexibilidad de la molécula de ARN, pero al mismo tiempo, estabilidad.

Esto respalda la importancia que tiene como elemento clave en la replicación viral, como posible blanco terapéutico hacia betacoronavirus.

8. 3. Análisis de marcadores de resistencia para remdesivir

Se realizó una recopilación de marcadores de resistencia a remdesivir reportados en la literatura, con el objeto de identificar mutaciones en la nsp12, parte catalítica de la RdRp de SARS-CoV-2, asociadas con disminución en la sensibilidad a este antiviral. Los marcadores identificados se muestran en la Tabla 14. La selección de remdesivir para este análisis se basó en su mecanismo de acción directo sobre la RdRp y en la disponibilidad de reportes previos que describen mutaciones de resistencia en nsp12. Entre las mutaciones analizadas, la combinación V791I + S759A ha sido la que ha mostrado mayor efecto, con un incremento de hasta 38 veces en el valor de EC_{50} . De manera individual, la mutación A97V se asoció con un aumento de hasta 20 veces en el IC_{50} . Asimismo, la combinación de tres mutaciones (N198S + V166A + S759A) confiere un incremento aproximado de 10.4

veces en el EC₅₀, lo que sugiere un efecto acumulativo sobre la resistencia al fármaco (Focosi et al., 2022; Stevens et al., 2022).

Debido a la masividad de los datos genómicos disponibles para Estados Unidos, su análisis no se incluyó en esta sección de resultados. Este análisis no fue descartado, si no que se contempla como parte de un estudio posterior que permitirá abordar el total de secuencias de manera detallada.

Tabla 14: Marcadores de resistencia para el antiviral remdesivir analizados en este trabajo.

Marcador de resistencia	Efecto	Referencia
V791I + S759A	•Confiere un aumento de hasta 38 veces en el EC50 de Remdesivir	(Stevens et al., 2022)
S759A	•Confiere un aumento de hasta 8 veces en el EC50 de Remdesivir	(Stevens et al., 2022)
N198S + V166A + S759A	•Confiere un aumento de hasta 10.4 veces en el EC50 de Remdesivir	(Stevens et al., 2022)
V166A	•Confiere un aumento de hasta 2.7 veces en el EC50 de Remdesivir	(Stevens et al., 2022)
C799F	•Confiere un aumento de hasta 8 veces en el EC50 de Remdesivir	(Stevens et al., 2022)
C799R	•Confiere un aumento de hasta 8 veces en el EC50 de Remdesivir	(Stevens et al., 2022)
A97V	•Aumenta la resistencia a Remdesivir hasta 20 veces en IC50	(Focosi et al., 2022)
E802D/A	•Aumenta la resistencia a Remdesivir hasta 6 veces en IC50	(Focosi et al., 2022)

Para el análisis informático se descargaron secuencias de SARS-CoV-2 provenientes de Norteamérica (Canadá y México), Centroamérica y Sudamérica, con el fin de identificar la presencia de marcadores de resistencia a remdesivir. En la Tabla 15 se presenta el número total de secuencias analizadas hasta el momento, considerando únicamente aquellas obtenidas de hospedero humano, procedentes de muestras orofaríngeas y recolectadas en el periodo comprendido entre el 1 de mayo de 2020 y el 31 de diciembre de 2024.

Tabla 15: Secuencias descargadas de Norte, Centro y Sudamérica para análisis de marcadores de resistencia. Se muestra el total y las que tienen el ORF1ab para hacer la búsqueda específica del marco de lectura de nsp12

País	Número de secuencias descargadas	Secuencias con ORF1ab
México	13,488	807
Canadá	492	24
Bermudas	1,468	94
Belice	48	4
República Dominicana	3,276	245
Haití	3,156	216
Guatemala	708	53
Jamaica	3,372	246
Argentina	2,863	205
Brasil	207,429	12,325
Chile	7,092	210
Colombia	13,996	327
Paraguay	3,368	131
Ecuador	164	2
Perú	8847	318
Uruguay	834	53
Venezuela	294	22

Total: 21 países	Total: 270,895 secuencias descargadas	Total: 22,675 secuencias con ORF1ab
-------------------------	--	--

A partir del análisis de secuencias genómicas de SARS-CoV-2 provenientes de 21 países, se descargaron un total de 270,895 secuencias. De este conjunto, se identificaron 22,675 secuencias que contenían la región ORF1ab completa, las cuales fueron seleccionadas para el análisis de posibles marcadores de resistencia a remdesivir.

Del total de secuencias de SARS-CoV-2 descargadas se filtraron solo las que se pudieran analizar las secuencias con “ORF 1ab polyprotein” las cuales contienen la secuencia de la RdRp. Los países con mayor número de secuencias con ORF1ab fueron, en primer lugar, Brasil con 17,255 secuencias, en segundo lugar, México con 1,124 secuencias y, en tercer lugar, Colombia con 1,259 secuencias.

Tras el análisis bioinformático, se identificaron marcadores asociados a resistencia a remdesivir en secuencias provenientes de Canadá, Ecuador y Brasil, siendo este último el país con el mayor número de secuencias que presentaron dichos marcadores.

Tabla 16: Países de América donde se encontraron marcadores de resistencia a remdesivir

País	Número de secuencias descargadas	Secuencias con ORF1ab	Marcadores de resistencia	Marcadores presentes	Porcentaje de secuencias ORF1ab con marcadores de resistencia
Canadá	492	41	V166A	L166 (2)	4.87%
Ecuador	164	2	N198S	S198 (1)	50%
Brasil	207,429	17,255	S759A	D759 (3)	0.017%
Brasil	207,429	17,255	V792I	F792 (2), M792 (1)	0.011% 0.0057%
Brasil	207,429	17,255	N198S	A198 (2), T198 (1)	0.011% 0.0057%
Brasil	207,429	17,255	V166A	E166 (2)	0.011%
Brasil	207,429	17,255	C799F	T799 (1), W799 (2)	0.0057% 0.011%
Brasil	207,429	17,255	A97V	K97 (1), T97 (2), V97 (10)	0.0057%, 0.011%, 0.057%
Brasil	207,429	17,255	E802D	D802 (1) , T802 (2)	0.0057%, 0.011%

En la Tabla 16 se presentan los marcadores de resistencia identificados en la RdRp de SARS-CoV-2 en secuencias provenientes de países del continente americano. En el caso de Canadá, se analizaron 41 secuencias, de las cuales dos presentaron

un cambio de aminoácido en la posición V166, correspondiente a la sustitución de valina (V) por leucina (L). Esto representó un 4.87 % de secuencias con marcadores de resistencia con respecto al total de secuencias con ORF1ab descargadas para este país.

En Ecuador, se analizaron dos secuencias, de las cuales una presentó el marcador de resistencia N198S, asociado a un incremento de hasta 10.4 veces en el EC50 de remdesivir, lo que correspondió a un 50 % de secuencias con marcadores de resistencia respecto al total de secuencias con ORF1ab disponibles para este país.

Por su parte, Brasil fue el país con el mayor número de secuencias analizadas (17 255). En este conjunto se identificaron 11 secuencias con el marcador A97V y una secuencia con la mutación E802D, lo que correspondió a una frecuencia de 0.057 % y 0.0057 %, respectivamente, en relación con el total de secuencias con ORF1ab.

En conjunto, estos resultados indican que, aunque se detectaron marcadores de resistencia a remdesivir en secuencias de RdRp provenientes de países del continente americano, su frecuencia general fue baja. En países con un alto número de secuencias disponibles, como Brasil, los marcadores se identificaron en proporciones inferiores al 0.1 %, lo que sugiere una circulación limitada de variantes con potencial de resistencia. En contraste, los porcentajes elevados observados en países con un número reducido de secuencias, como Ecuador, deben interpretarse con cautela, debido al tamaño de muestra limitado. En conjunto, los hallazgos sugieren que, aunque existen mutaciones asociadas a una disminución de la susceptibilidad a remdesivir, estas no parecen ser prevalentes ni indicar un fenómeno de resistencia ampliamente establecido en la población viral analizada.

8. 4. Diseño de vectores de expresión para las proteínas nsp12, nsp7 y nsp8 de SARS-CoV-2

Se diseñaron tres vectores para la expresión de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12 de SARS-CoV-2 variante JN.1 en las células Expi 293. Las secuencias se optimizaron para codones humanos, los ORF se flanquearon por los sitios *Bam*HI y *Xho*I para la posterior inserción en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen), bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Se incluyó una secuencia Kozak antes del codón de inicio, un péptido señal en el extremo N-terminal de cada ORF, el cual permite dirigir la proteína recombinante hacia la vía secretora celular, facilitando su secreción al medio extracelular. De igual manera se agregó una etiqueta 6xHis en el extremo C-terminal que permite la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a metales, al unirse específicamente a matrices con níquel. Finalmente, se añadió un codón de paro, como se muestra en las Figuras 16, 17 y 18.

NSP7

BamHI-Kozak-Signal peptide-NSP7-HisTag-Stop Codon-XhoI

ATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTTGGTACCGAGCTC**GGATCC**AGTACCCTTCTTGCCACCATGGGC
TGGAGCTGTATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCACAGGCGTGCACAGC**TCCAAGATGAGCGATGTGAAGT**
GCACAAGCGTGGTGCTGCTGAGCGTGCTGCAGCAGCTGAGGGTGGAGTCTTCCAGTAAGCTGTGGGCCCAGTG
CGTGCAGCTGCACAATGACATTCTGCTGGCCAAGGACACCACCGAGGCTTTTGAAGAAGATGGTGAGCCTGCTG
TCTGTGCTGCTGTCAATGCAGGGGGCCGTGGACATCAACAAGCTGTGCGAGGAGATGCTGGACAACAGGGCCA
CCCTGCAGCATCATCACCATCACCATTGACTCTCGAGAAGGGTCAAGACAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGG

Figura 16: Diseño esquemático de la secuencia para la expresión de la proteína nsp7 de SARS-CoV-2 en pcDNA3.1. Las letras en color negro sin resaltar corresponden al sitio de multiclonación del vector.

NSP8

BamHI-Kozak-Signal peptide-NSP8-HisTag-Stop Codon-XhoI

ATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTTGGTACCGAGCTC**GGATCC**AGTACCCTTGGCCACCATGGGCTGG
AGCTGTATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCACAGGCGTGCACAGC**GCCATCGCCAGCGAATTTAGCTCAC**
TGCCTAGCTACGCCGCCTTCGCCACAGCCAGGAGGCTACGAGCAGGCTGTTGCCAACGGCGATTCCGAAGT
GGTGCTGAAGAAGCTGAAAAAGTCTCTGAACGTGGCCAAGAGCGAGTTTGACCGCGACGCCGCAATGCAGCGG
AAGCTGGAGAAGATGGCCGACCAAGGCCATGACCCAGATGTACAAGCAGGCCAGGAGTGAGGACAAGAGGGCCA
AGGTTACCAAGCGCCATGCAGACCATGCTGTTTACCATGCTGCGGAAGCTGGACAACGATGCTCTGAACAACAT
TATCAACAACGCTAGAGATGGGTGTGTGCCCTGAACATCATCCCACTGACCAACGCCGCCAAGCTGATGGTG
GTGATTCCCGACTACAATACCTACAAAAACACCTGCGACGGCACCACATTACATACGCCCTCCGCCCTGTGGG
AGATCCAGCAAGTGGTGGACGCCGACTCTAAAAATCGTGCAGCTGAGCGAAATCAGCATGGATAATTCTCCAAA
TCTGGCCTGGCCACTGATCGTGACCGCCCTGAGGGCCAACCTCCGCCGTGAACTGCAGCATCATCACCATCAC
CATGACTCTCGAGAAGGGTCAAGACAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGTCTAGAGGGCCCGCGT
TCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTGTTTAAACCCGCTGATC

Figura 17: Diseño esquemático de la secuencia para la expresión de la proteína nsp8 de SARS-CoV-2 en pcDNA3.1. Las letras en color negro sin resaltar corresponden al sitio de multiclonación del vector.

NSP12
BamHI-Kozak-Signal peptide-**NSP12**-**HisTag**-**Stop Codon**-**XhoI**

ATAGGGAGACCCAAAGCTGGCTAGTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAGTACCCCTTGCCACCATGGGCTGG
AGCTGTATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCACAGGCGTGCAAGCTCCGCGGACGCTCAGAGCTTCTCTGA
ACCGCGTGTGCGGCGTGAGCGCGCTCGACTGACACCATCGGCGACCGGACCTCTACTGACGCTGCTGTACAG
GGCCTTTGATATTTACAAACGACAAAGTGGCTGGATTTGCCAAGTTCCTGAAGACCAATTGCTGCAGATTCAG
GAGAAGACGAGGACGATAACCTGATCGACAGTACTTCTGGTGGTGAAGAGACACACATTTCTAATTATCAGC
ACGAGGAACCATTTTACAACCTGCTGAAAGACTGCCAGCGGTGGCCAAACACGACTTTTCAAGTTCCGCAT
CGACGGAGATATGGTGGCCACATATCAGTAGACAGAGACTGACTAAGTACACGATGGCCGATCTGGTGTACGCT
CTGCGGCACCTTCGATGAGGGCACTGTGATACCTGAAGGAGATTCTGGTGACTTACAATTGCTGCGACGACG
ACTACTTTAACAAGAAGGACTGGTACGACTTTGTGGAGAATCCTGACATCCTGAGAGTCTACGCCAACCTGGG
CGAGCGGGTGGCGGACGGCCCTTCTGAAGACCGTCCAGTTTTCGCGACGCTATGAGAAATGCTGGCATCGTGGGA
GTGCTGACACTGGACAACCAAGACCTCAATGGCACTGGTACGACTTCGGAGATTTCATCCAGACCCACCTG
GCAGCGGCGTGCCAGTGGTGGATTCTACTACTGCTGCTGATGCTATCCTGACCTGACAAGAGCAGTACG
TGCCGAGTCCCATGTGGATACAGATCTGACTAAGCCATACATCAAGTGGGATCTGCTGAAGTACGACTTCACA
GAAGAAGGCTGAAGCTGTTTGTAGGTACTTTAAGTACTGGGACGAGACCTACCAACCAATTCGCTGAACT
GCCTGGAGACCGCTGCATTCGACTGTGCCAATTTAATGTGCTGTTTCTACCGTCTTCCCTCTGACAAG
CTTCGGACCCCTGGTGGGAAAGATTTTCTGGATGGCGTGCCATTCTGGTGTGCCACCGGTTACCACTTTAGA
GAATCGGCGTGGTGCAACACGAGGAGTGAATCTGCATTCTAGCAGGCTGAGCTTCAAGGAGCTGCTGGTGT
ATGACGCCGACCCAGCGATGCATGCTGCTCGGAACTGCTGCTGGACAGAGAACCACTGTTTTCGCT
GGCAGCACTGACCAATAACCTGGCTTTCCAGACGGTGAAGCCAGGAACTTCAACAAAGATTCTATGATTTC
GCCGTGAGCAAGGGCTTCTTCAAGGAGGGCTCCAGCGTGGAGCTGAAGCACTTCTTCTTCGCCAGGACGGTA
ACGCCGCCATCAGCGACTACGACTACTACCGGTACAATCTGCCACCATGTGCGATATCAGACAGTACTGTT
CGTGGTCGAGGTGGTGATAAGTACTTTCGACTGCTACGATGGCGGATGCATTAACGCCAATCAGGTGATCGTG
AACAACTGGATAAATCCGCTGGCTTCCCTTTAATAAGTGGGGCAAGGCCAGACTGTATTATGACTCTATGT
CTTATGAGGATCAGGACGCACTGTTGCGCTACACCAAAAGAAACGTGATCCCCACCATCACACAGATGAATCT
GAAGTACGCAATTAGCGCCAAAATAGGGCCAGAACCGTGGCTGGGGTGCCATCTGCTCAACTATGACCAAC
CGCCAGTTCACCCAGAAGCTGCTGAAATCTATCGCCGCCACAGAGGGGCTACCGTGGTGATTGGGACAAGCA
AGTTTACGGCGGGTGGCACAATATGCTGAAGACCGTGTATAGCGAGCTGGAAAACCCACACCTGATGGGCTG
GGACTACCTAAATGCGATAGGGCTATGCCCAATATGCTGAGAATCATGGCTCTCTGGTGTGGCAAGGAAG
CACACAACCTGTTGCGAGCTGTCCACAGATTCTATCGGCTGGCCAACGAGTGTGCCAGGTGCTGTCCGAGA
TGGTGATGTGCGGGTCACTCTGTATGTGAAGCTGGCGGCACTCCAGCGGAGACGCTACAACCGCTACGC
CAACTCTGTGTTCAACATCTGCCAGGCGGTGACTGCCAATGTGAACGCCCTGCTGAGCACAGACGGCAACAAG
ATCCCGCAGCAAGTATGTGCGGAACCTGCAGCACAGACTGTACGAGTGTCTGTATAGGAATAGAGACGTGGATA
CCGACTTCGTCAACAGATTCTACGCTATCTGCGCAAGCACTTTCAATGATGATTCTGAGCGACGATGCCGT
GGTGTGCTTCAATTCACCTACGCATCACAGGGGCTGGTGGCTCTATCAAGAAATTTAAGAGCGTCTCTGTAC
TATCAGAACAATGTGTTTATGAGTGAAGCCAAAGTGTGGACCGAGACCGATCTGACCAAGGGCCACACAGAT
TTTCAGCCAGCACACAATGCTGGTGAAGCAGGAGACGACTACGTGTACCTGCCCTATCCTGATCCAGCCG
CATCCTGGGCGCTGGATGCTTCGTGGACGACATCGTGAAGACCGATGGCACCTGATGATCGAAAGGTTTGTG
TCCCTGGCCATCGACGCTATCCTCTGACCAAGCATCCCAACAGGAATACGCCGACGTTTCCATCTGTATC
TGCAGTACATCAGAAAATGCTGACGAGCTGACCGGACACATGCTGGACATGTACTCGTGATGCTGACCAA
CGACAATACCTCCCGGTATTGGGAGCCCGAATTCATGAGGCCATGTACACACCCACACTGTGCTTCAGCAT
CATCAACATCAACATGAGCTCGGAAGGGTCAAGACAAATTCGACGATATCCAGCACAGTGGCGGCGCTAG

Figura 18: Diseño esquemático de la secuencia para la expresión de la proteína nsp12 de SARS-CoV-2 en pcDNA3.1. Las letras en color negro sin resaltar corresponden al sitio de multiclonación del vector.

El tamaño en nucleótidos, aminoácidos y peso molecular de cada una de las proteínas recombinantes se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17: Características moleculares de las proteínas recombinantes nsp7, nsp8 y nsp12 de SARS-CoV-2

Proteínas de RdRp de SARS-CoV-2	Nucleótidos	Aminoácidos	Peso Molecular (kD)
Nsp7	356	108	10 – 11
Nsp8	698	223	22
Nps12	2898	956	106 – 107

Los marcos de lectura diseñados para cada una de las proteínas se solicitaron a la compañía GeneScript, que los sintetizó e insertó en el vector pUC57.

8. 5. Construcción de plásmidos de expresión a partir de pCIN3.1

Para el diseño de los plásmidos para las nsp7, nsp8 y nsp12 se utilizó como base el vector pcDNA3.1 (5514 pb), el cual se obtuvo a partir del plásmido pCIN3.1 (6,090 pb), previamente construido en nuestro laboratorio y que contiene el marco de lectura de la proteína de la cápside del virus de la hepatitis C (580 pb).

El vector pcDNA3.1 contiene el promotor CMV para expresión en células de mamífero, una señal de terminación BGH poly(A). Además, de un marcador de selección en bacterias (AmpR) y otro para células eucariotas (NeoR/KanR), como se puede observar en la Figura 19.

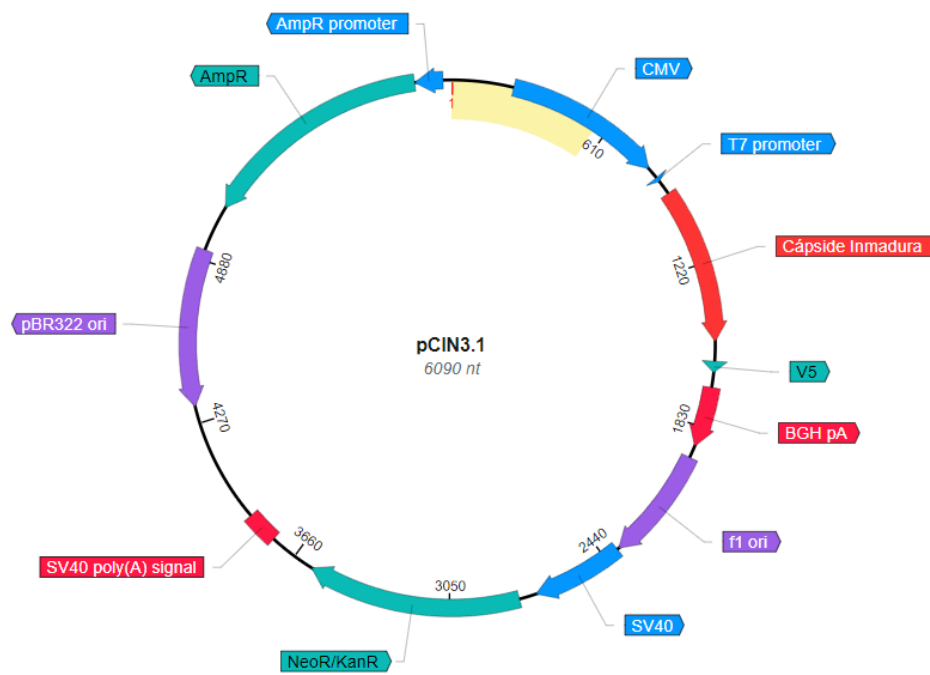


Figura 19: Mapa esquemático de plásmido pCIN3.1 (6090 pb). Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0.

Se verificó el plásmido mediante restricción enzimática, haciendo el corte con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I. De igual manera a partir de la restricción enzimática se hizo la purificación de pcDNA3.1 para utilizarlo posteriormente como vector.

En la Figura 20 se muestra restricción enzimática de pCIN3.1. En el primer carril se observa el marcador estándar de ADN de 1 kb GeneRuler Thermo Scientific (SM0311), en el segundo carril la restricción enzimática con *Bam*HI y *Xho*I que muestra el tamaño del plásmido en 5469 pb y del inserto de la cápside de la hepatitis C en 621 pb, el tercer carril la digestión con *Bam*HI en 6090 pb y el cuarto carril la digestión con *Xho*I 6090 pb. El análisis de restricción permitió verificar la presencia del inserto en el plásmido pcDNA3.1, observándose las bandas en los tamaños esperados.

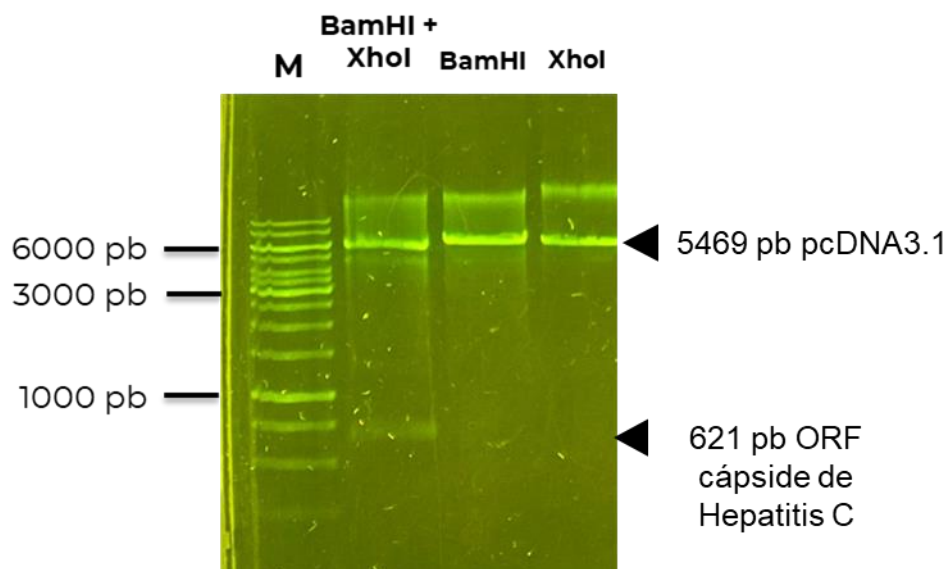


Figura 20: Restricción enzimática de pCIN3.1 con *Bam*HI y *Xho*I

8. 6. Construcción de plásmido de expresión pCDNSP7

Los marcos de lectura abiertos correspondientes a nsp7, nsp8 y nsp12, previamente modificados con las señales necesarias para su expresión, se adquirieron clonados en el vector pUC57, el cual contiene el gen de resistencia a ampicilina (AmpR) y el origen de replicación pUC ori. Las figuras incluidas en esta sección se presentan agrupadas según el tipo de resultado experimental descrito, por lo que su mención en el texto no siempre sigue un orden estrictamente consecutivo. Los mapas de los plásmidos pUCNSP7, pUCNSP8 y pUCNSP12 se muestran en las Figuras 21, 25 y 29, respectivamente.

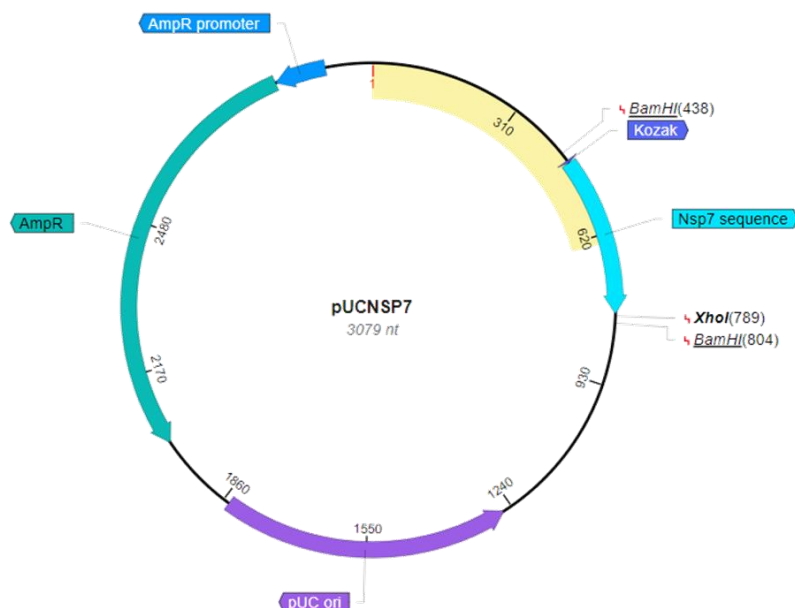


Figura 21: Mapa esquemático del plásmido pUCNSP7 (3079 pb) que contiene el ORF de nsp7. Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0

8. 7. Verificación y subclonación de los marcos de lectura en pcDNA3.1

La integridad de los plásmidos pUCNSP7, pUCNSP8 y pUCNSP12 se verificó mediante digestión enzimática con *Bam*HI y *Xho*I, lo que permitió confirmar la presencia de los insertos y, simultáneamente, obtener los ORF correspondientes para su subclonación en el vector de expresión pcDNA3.1.

Los análisis de restricción mostraron bandas con los tamaños esperados para cada plásmido y su respectivo inserto, confirmando la correcta construcción de los vectores pUC57 recombinantes (Figuras 22, 26 y 30).

8. 8. Construcción y confirmación de los plásmidos de expresión

Los marcos de lectura purificados se ligaron al vector pcDNA3.1, el cual contiene el promotor CMV para expresión en células de mamífero, la señal de terminación BGH poly(A), así como los marcadores de selección AmpR para bacterias y NeoR/KanR

para células eucariotas. Los mapas de los plásmidos recombinantes pcDNSP7, pcDNSP8 y pcDNSP12 se muestran en las Figuras 23, 27 y 31, respectivamente.

La correcta construcción de los plásmidos de expresión fue confirmada mediante digestión con *Bam*HI y *Xho*I, liberando fragmentos correspondientes a los ORF en los tamaños esperados. Los patrones de restricción obtenidos para pcDNSP7, pcDNSP8 y pcDNSP12 se presentan en las Figuras 24, 28 y 32, respectivamente, confirmando la inserción adecuada de cada ORF en el vector pcDNA3.1.

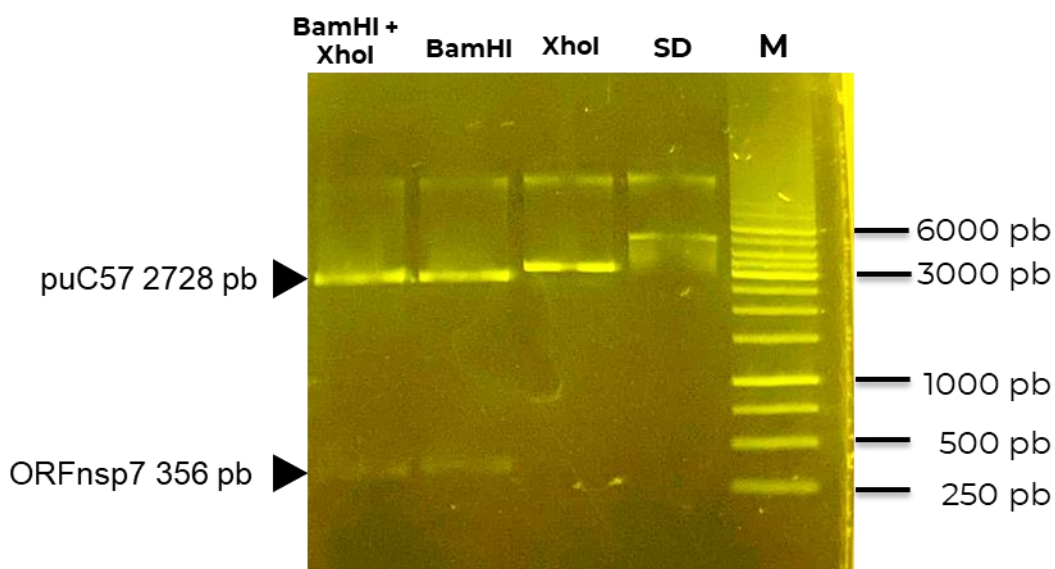


Figura 22: Análisis por restricción enzimática del plásmido pUCNSP7 utilizando las enzimas *Bam*HI y *Xho*I, confirmando la presencia del ORF de nsp7

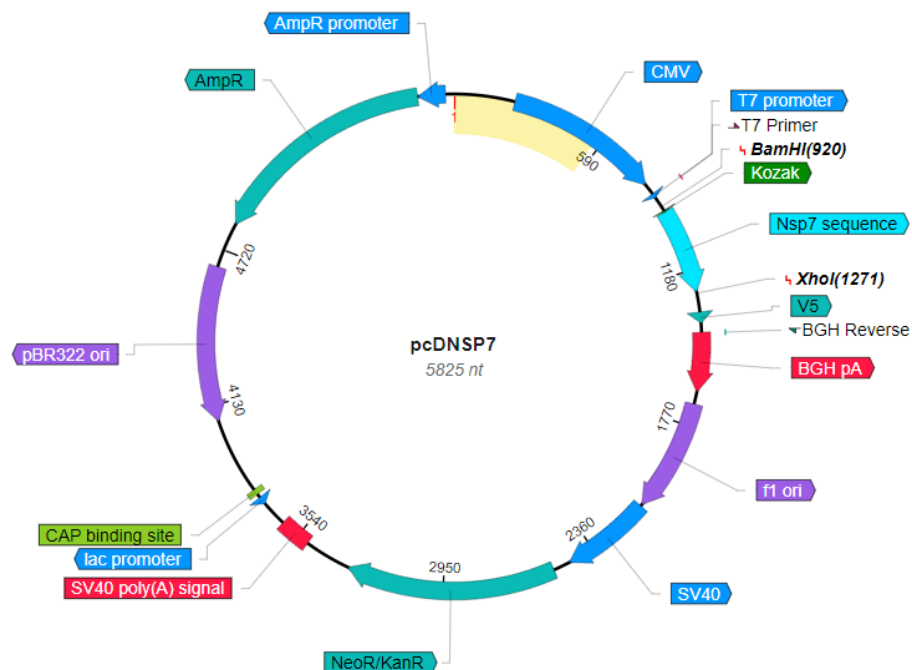


Figura 23: Mapa esquemático del plásmido de expresión pcDNSP7 (5825 pb), derivado del vector pcDNA3.1, que contiene el ORF de nsp7. Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0.

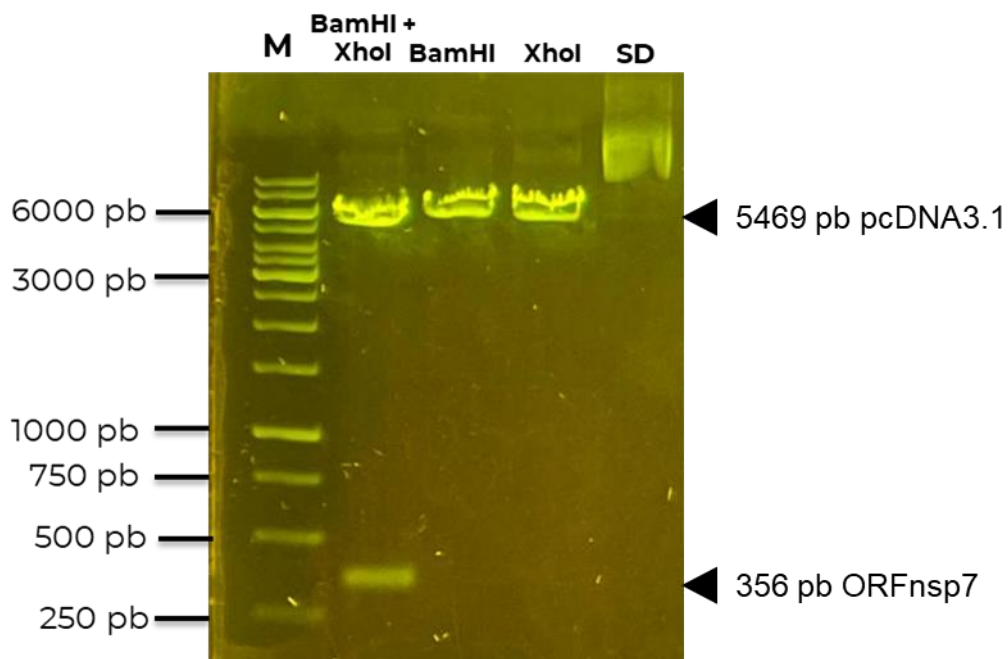


Figura 24: Análisis por restricción enzimática del plásmido pcDNSP7 con *Bam*HI y *Xho*I, mostrando la liberación del inserto correspondiente al ORF de nsp7

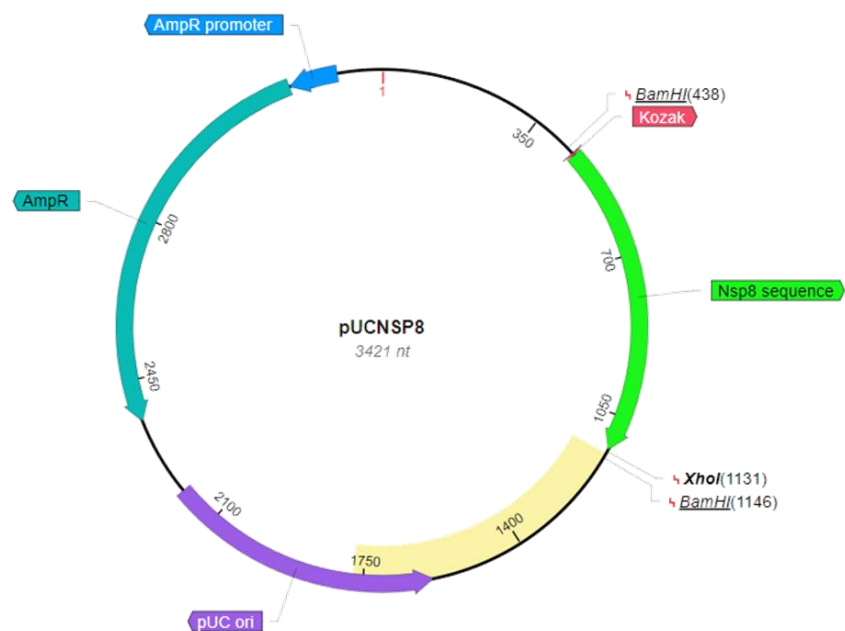


Figura 25: Mapa esquemático del plásmido pUCNSP8 (3421 pb) que contiene el ORF de nsp8. Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0.

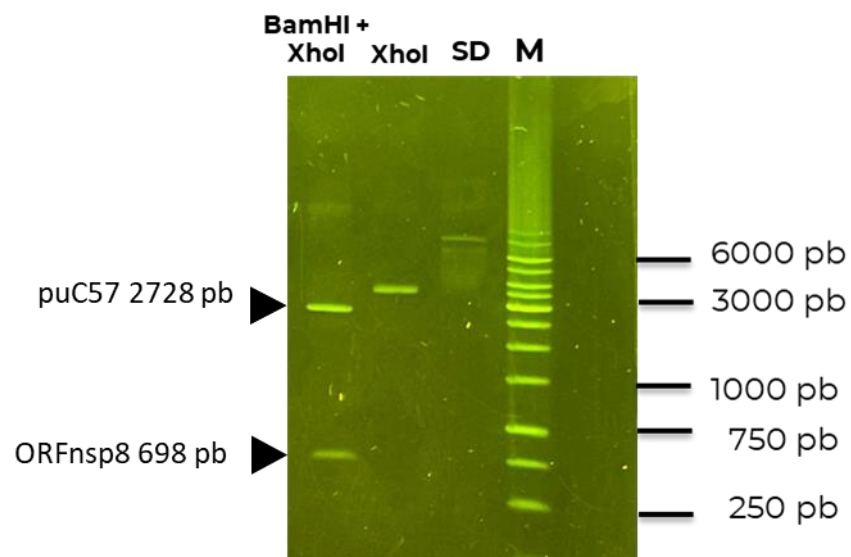


Figura 26: Análisis por restricción enzimática del plásmido pUCNSP8 mediante digestión con BamHI y XhoI, confirmando la presencia del ORF de nsp8

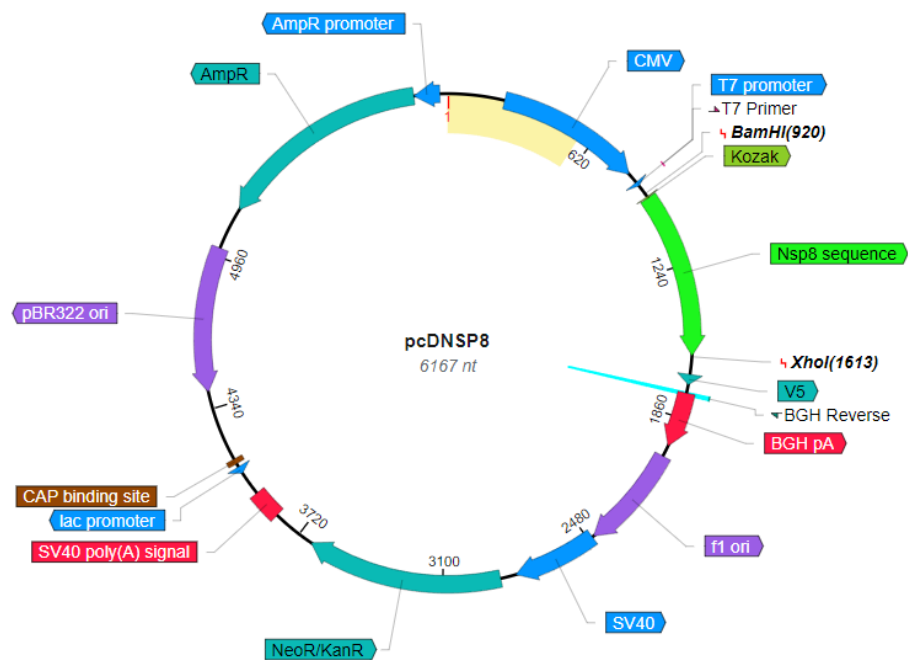


Figura 27: Mapa esquemático del plásmido de expresión pcDNSP8 (6167 pb), basado en el vector pcDNA3.1, que contiene el ORF de nsp8. Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0

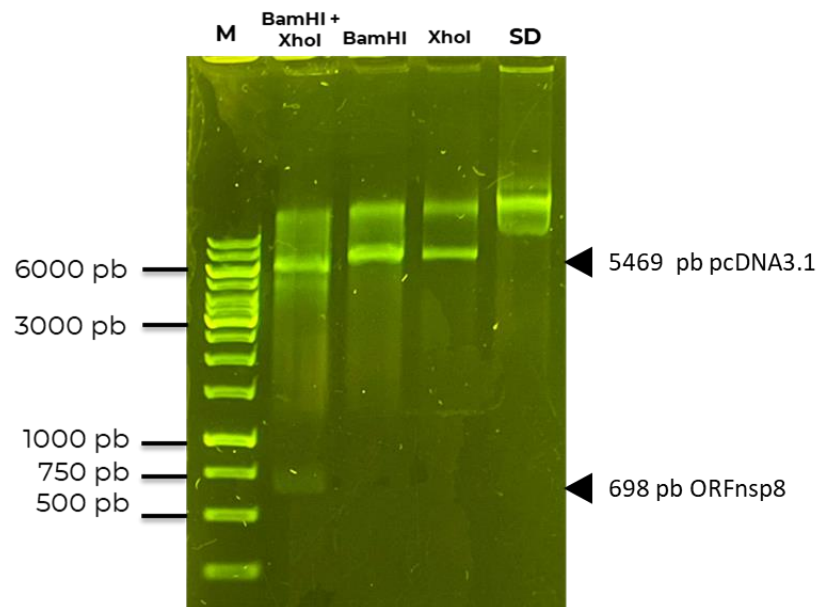


Figura 28: Análisis por restricción enzimática del plásmido pcDNSP8 con BamHI y XhoI, evidenciando la liberación del ORF de nsp8

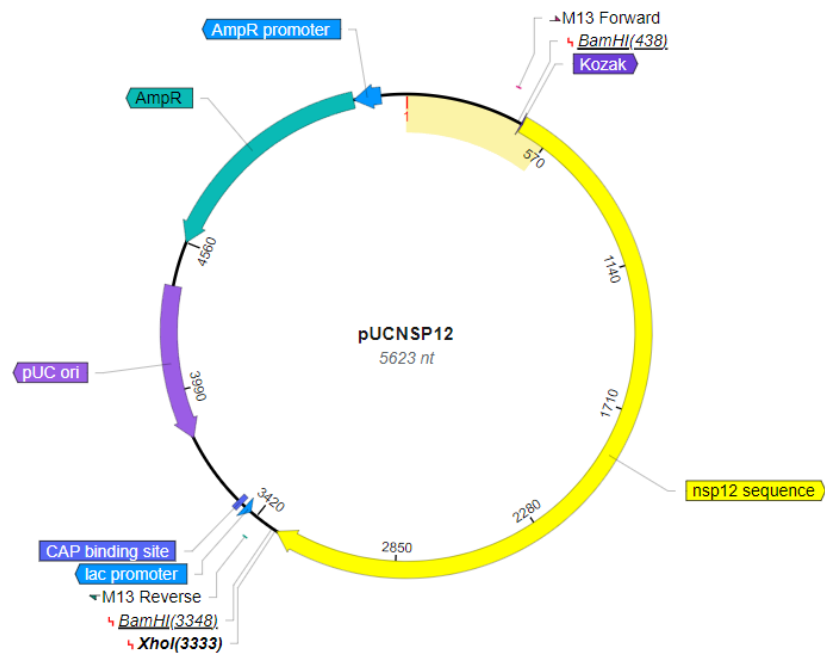


Figura 29: Mapa esquemático del plásmido pUCNSP12 (5623 pb) que contiene el ORF de nsp12. Representación realizada en VectorBee versión 2.7.0

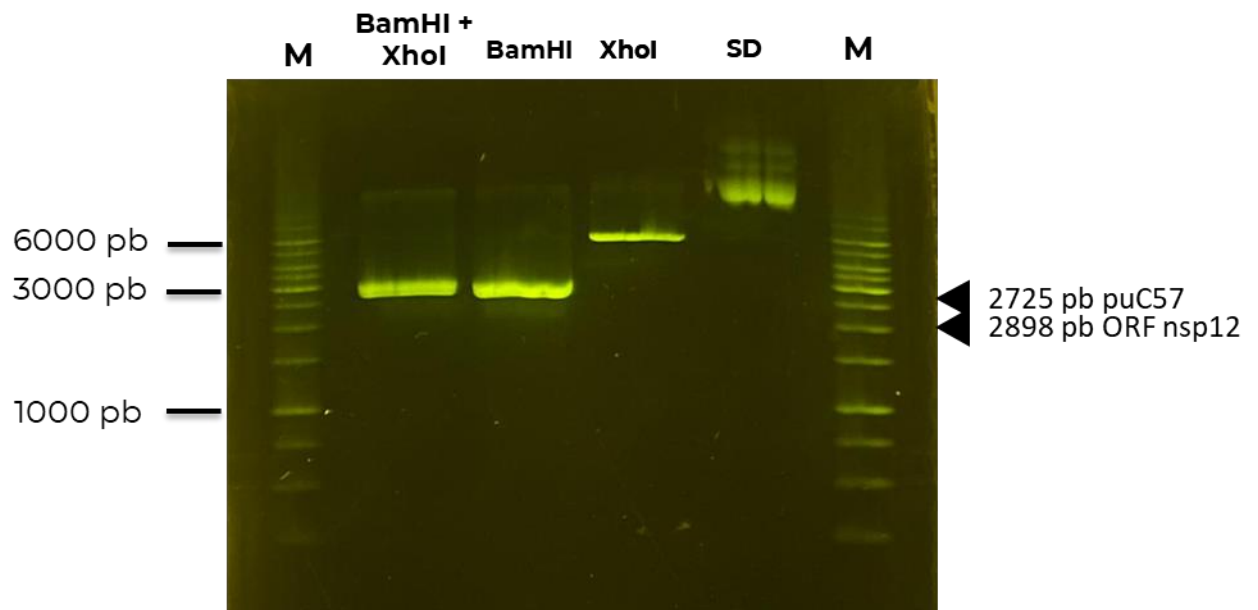


Figura 30: Análisis por restricción enzimática del plásmido pUCNSP12 utilizando BamHI y XhoI, confirmando la presencia del ORF de nsp12

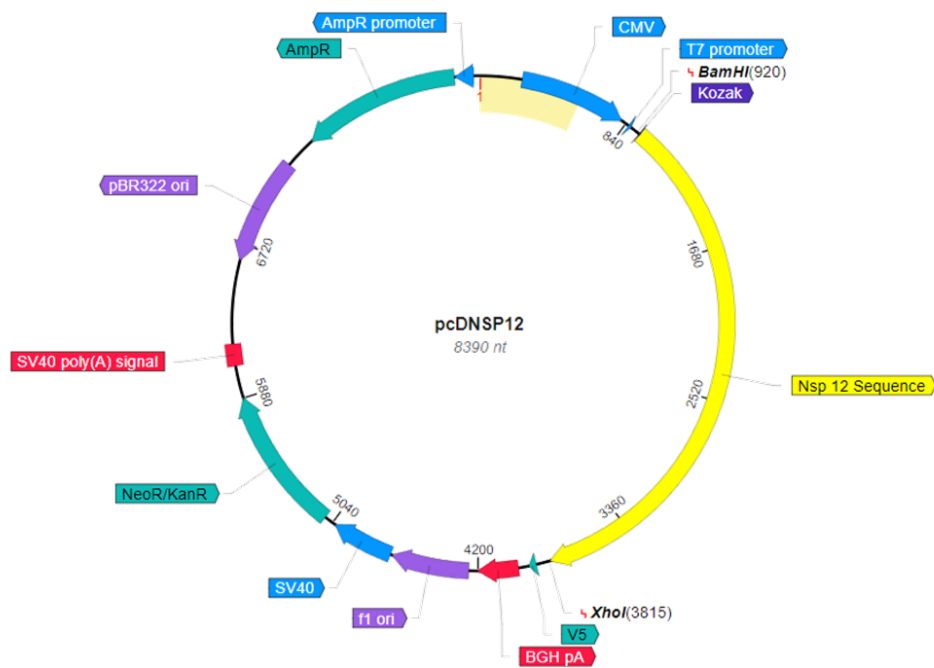


Figura 31: Mapa esquemático del plásmido de expresión pcDNSP12 (8390 pb), derivado del vector pcDNA3.1, que contiene el ORF de nsp12. Representación realizada en VectorBee versión 2.1.0

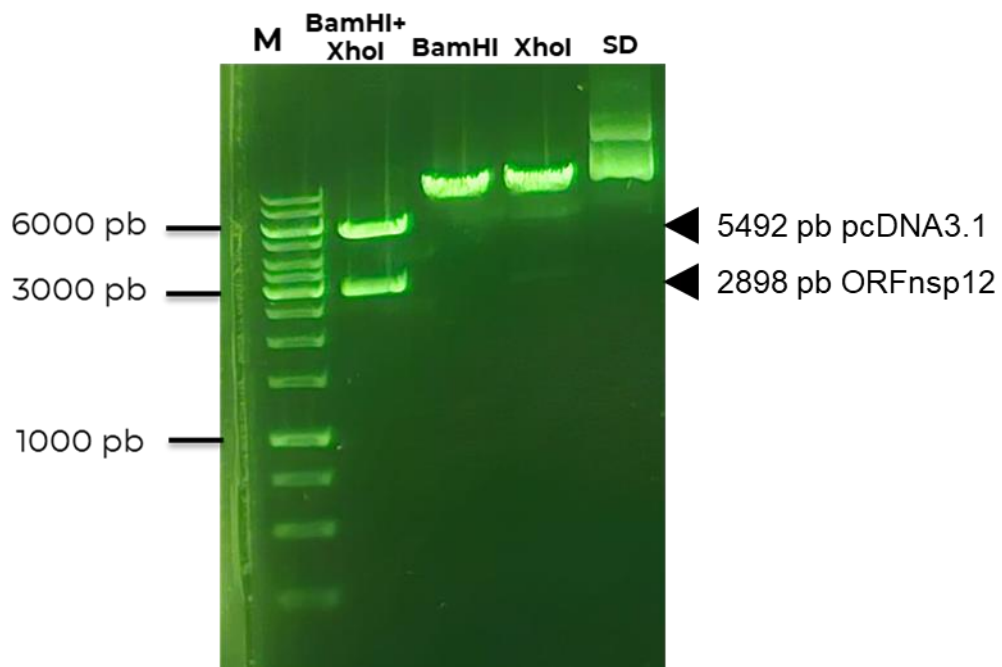


Figura 32: Análisis por restricción enzimática del plásmido pcDNSP12 con *Bam*HI y *Xho*I, mostrando la liberación del inserto correspondiente al ORF de nsp12

8. 9. Verificación de los plásmidos pcDNSP7, pcDNSP8 y pcDNSP12

La correcta inserción de los marcos de lectura correspondientes a nsp7, nsp8 y nsp12 en el vector pcDNA3.1 se confirmó mediante PCR, utilizando oligonucleótidos localizados en las regiones adyacentes al promotor CMV y a la señal de poliadenilación BGH (Tabla 18):

Tabla 18: Oligonucleótidos T7 y BGH para plásmido de expresión pcDNA3.1

Oligonucleótidos	Secuencia
T7 Forward	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
BGH Reverse	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

Las amplificaciones generaron productos con tamaños concordantes con los esperados para cada construcción: 568 pb para pcDNSP7, 910 pb para pcDNSP8 y 3133 pb para pcDNSP12, lo que confirma la presencia de los insertos en los plásmidos recombinantes. Los resultados de la amplificación por PCR se muestran en las Figuras 33, 34 y 35, respectivamente.

Adicionalmente, la identidad y orientación correcta de los marcos de lectura correspondientes a nsp7, nsp8 y nsp12 en los plásmidos recombinantes fueron confirmadas mediante secuenciación Sanger, verificándose la ausencia de mutaciones no deseadas en las regiones clonadas.

En conjunto, estos resultados confirman la correcta clonación de los ORF de nsp7, nsp8 y nsp12 en el vector pcDNA3.1, permitiendo su uso en los experimentos posteriores de expresión en células Expi293.

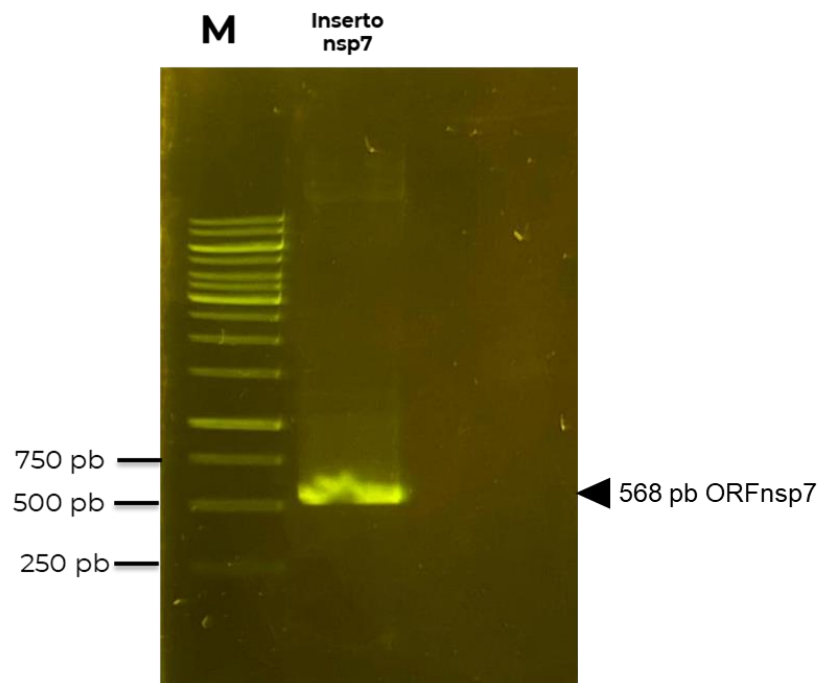


Figura 33: Verificación por PCR del plásmido pcDNSP7, mostrando la amplificación del ORF de nsp7

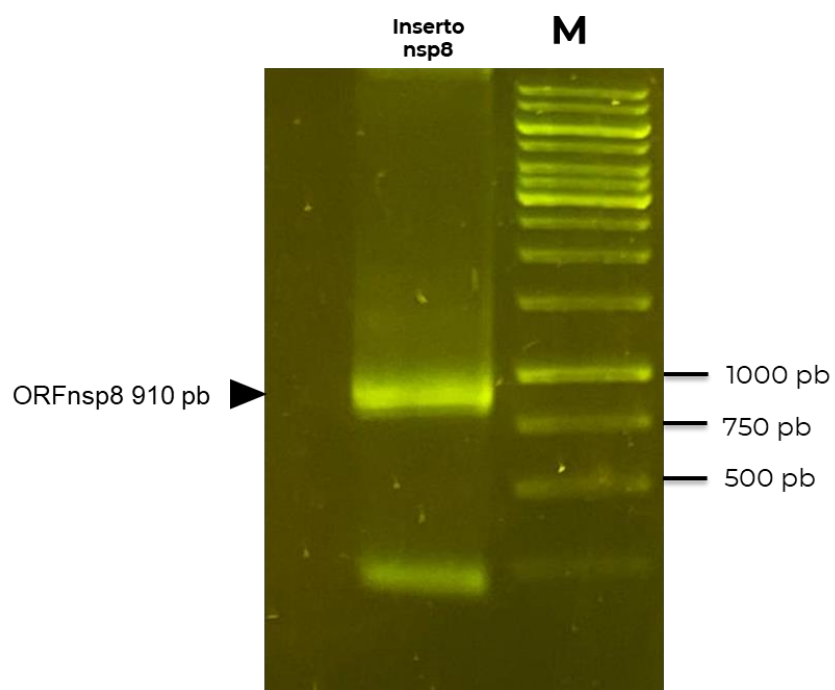


Figura 34: Verificación por PCR del plásmido pcDNSP8, evidenciando la amplificación del ORF de nsp8

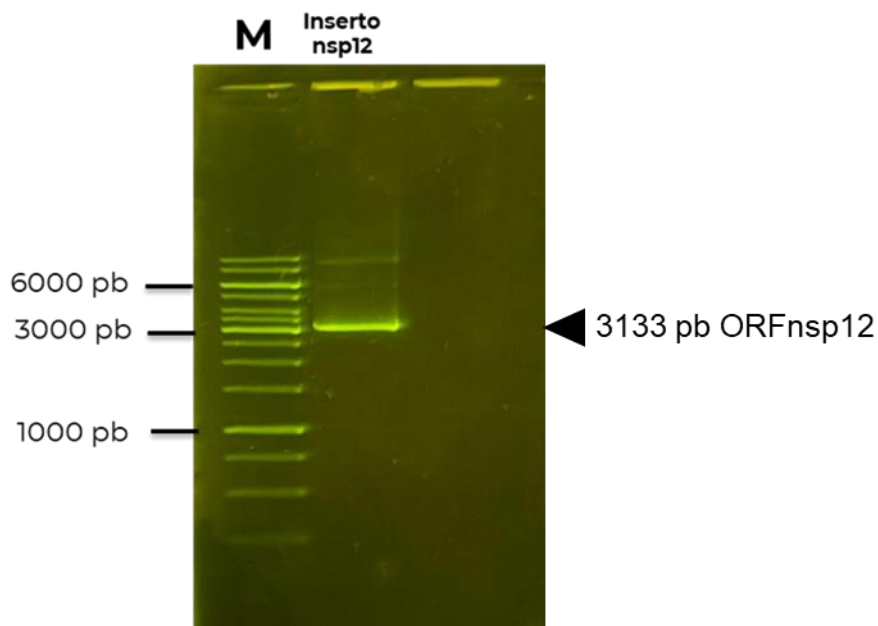


Figura 35: Verificación por PCR del plásmido pcDNSP12, mostrando la amplificación del ORF de nsp12

8. 10. Expresión y purificación de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12

Los tres plásmidos se produjeron y se purificaron en formato maxi para tener la mayor cantidad posible de cada uno de ellos para los ensayos de expresión y purificación de proteínas en células Expi 293. Estos ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) de Hermosillo, Sonora, bajo la supervisión del Dr. Jesús Hernández López y la colaboración de la M. en C. Maritza Alejandra Cordero Ortiz. Posteriormente, los sobrenadantes del cultivo celular que se obtuvieron se sometieron a FPLC en el equipo AKTA como se mencionó en la metodología.

8. 11. Identificación de proteínas de la RdRp de SARS-CoV-2

Con base a las concentraciones finales obtenidas, se calculó el rendimiento total de las proteínas purificadas. La concentración de las proteínas obtenidas se resume en la Tabla 19.

Tabla 19: Concentración de nsp7, nsp8 y nsp12

Proteína	Concentración
Nsp7	120.67 (µg/ml)
Nsp7 (concentrada)	416.72 (µg/ml)
Nsp8	129.0 (µg/ml)
Nsp8 (concentrada)	365.28 (µg/ml)
Nsp12 lote 1	280.31 (µg/ml)
Nsp12 lote 1 (concentrada)	638.57 (µg/ml)
Nsp12 lote 2	43.46 (µg/mL)

Para obtener el rendimiento total se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento total } (\mu\text{g o mg}) = \sum \left(\text{Concentración final } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \right) (\text{Volumen total de la fracción (mL)})$$

La proteína nsp7 se obtuvo a partir de tres reacciones de purificación, recuperándose dos fracciones eluidas por reacción con un volumen total de 0.8 ml y una concentración final de 120.67 µg/ml, lo que corresponde a un rendimiento total de 289.6 µg de proteína purificada.

A partir de una reacción de purificación de la proteína nsp8, se obtuvieron seis fracciones eluidas con un volumen total de 2.4 ml y una concentración final de 129.0 µg/ml, lo que corresponde a un rendimiento total de 309.6 µg de proteína purificada.

La proteína nsp12 se purificó en dos lotes independientes. En el lote 1, a partir de cuatro reacciones de purificación y tres fracciones eluidas por reacción, con un volumen de 0.55 ml por fracción y una concentración final de 280.31 µg/ml, se obtuvo un rendimiento total de 1.85 mg de proteína purificada. En contraste, el lote

2 presentó un rendimiento considerablemente menor, con un total de 67.8 µg recuperados a partir de cuatro reacciones y una fracción eluída por reacción con un volumen de 0.39 ml y una concentración final de 43.46 µg/mL, lo que sugiere variaciones en la eficiencia del proceso de expresión y purificación.

8. 12. Identificación de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12 de SARS-CoV-2 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

Como parte de la evaluación y purificación de las proteínas recombinantes de SARS-CoV-2, se analizaron las fracciones obtenidas por FPLC mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y con plata para la visualización de las proteínas.

8. 13. Tinción de azul de Coomassie y de plata para nsp7 de SARS-CoV-2

En la Figura 36 se muestra el gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie para las distintas muestras del proceso de obtención y purificación de la proteína nsp7. En el carril 1 y el carril 8 se cargó el marcador de peso molecular, para el carril 2 se colocó la muestra correspondiente a nsp7 obtenida en el FPLC en su forma concentrada y en el carril 9 la misma muestra, pero sin concentrar. En el carril 2 y 9 se observa una banda tenue con un peso molecular aproximado de 15 kD cercano al peso esperado de nsp7 y una banda adicional cercana a 150 kD.

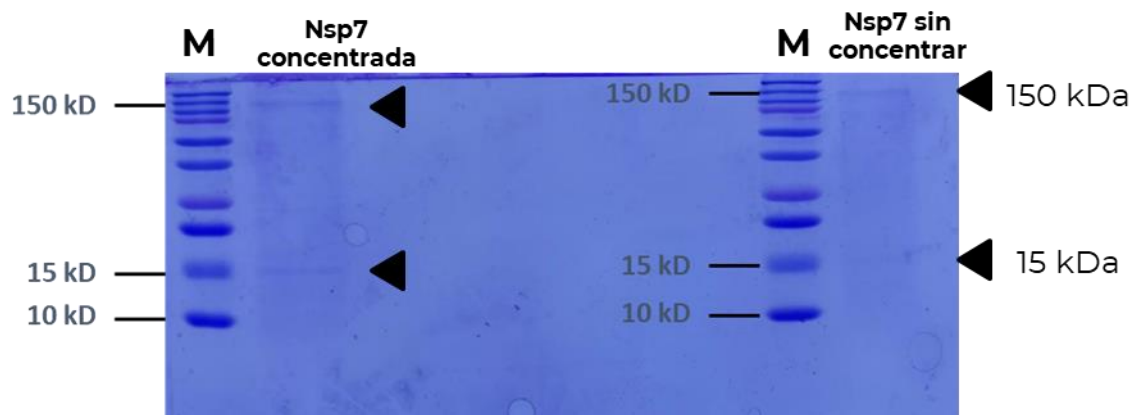


Figura 36: Tinción de Azul de Coomassie para la identificación de nsp7 de SARS-CoV-2. M - marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards de 250 kDa (1610374 Bio-Rad). Algunas de las bandas del marcador están marcadas con su tamaño en kDa

En la Figura 37 se muestra el gel de SDS-PAGE con tinción de plata para las distintas muestras de la proteína nsp7. En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular de 250 kD, para el carril 2 se colocó la muestra correspondiente a nsp7 en su forma concentrada y en el carril 3 la misma muestra, pero sin concentrar. En el carril 2 y 3 se observa banda de nsp7 en el peso esperado de 11 kD, de igual manera se observan bandas tenues en el 15, 25, 50 y 150 kD.

Esta muestra fue purificada mediante cromatografía de afinidad con níquel, utilizando un gradiente creciente de imidazol como paso adicional de elución para mejorar la pureza de la muestra.

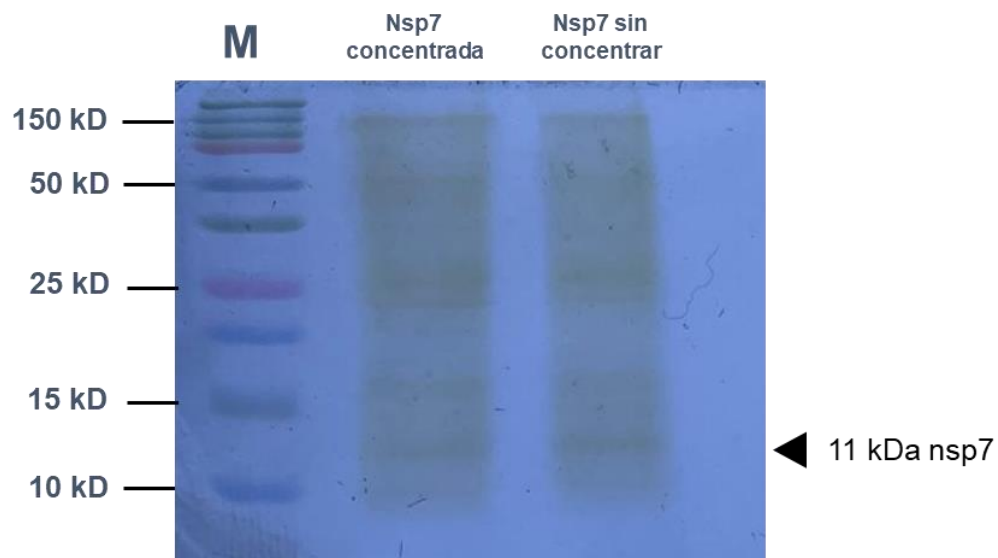


Figura 37: Tinción de plata para la identificación de nsp7 de SARS-CoV-2. M - marcador de peso molecular (1610374 Bio-Rad). Algunas de las bandas del marcador están marcadas con su tamaño en kDa

8. 14. Tinción de azul de Coomassie y de plata para nsp8 de SARS-CoV-2

En la Figura 38 se muestra el gel de SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie para la muestra de la proteína nsp8. En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular de 250 kD, para el carril 2 se colocó la muestra correspondiente a nsp8 en su forma concentrada. En el carril 2 se observa una banda tenue de nsp8 en el peso esperado de 22 kD.

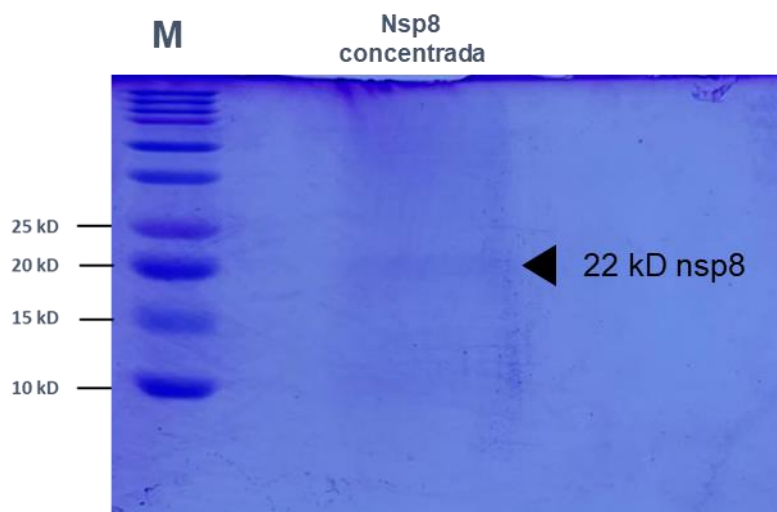


Figura 38: Tinción de Azul de Coomassie para la identificación de nsp8 de SARS-CoV-2. M - marcador de peso molecular (1610374 Bio-Rad). Algunas de las bandas del marcador están marcadas con su tamaño en kDa

En la Figura 39 se muestra el gel de SDS-PAGE con tinción de plata para la muestra de la proteína nsp8. En el carril 1 y el carril 5 se cargó el marcador de peso molecular de 250 kD, para el carril 3 se colocó la muestra de nsp8 sin concentrar y en el carril 7 la misma muestra, pero en su forma concentrada. En el carril 3 y 7 se observa banda de nsp8 en el peso esperado de 22 kD, de igual manera se observan bandas tenues en el 11, 14 y 26 kD.

Esta muestra fue purificada mediante cromatografía de afinidad con níquel, utilizando un gradiente creciente de imidazol como paso adicional de elución para mejorar la pureza de la muestra.

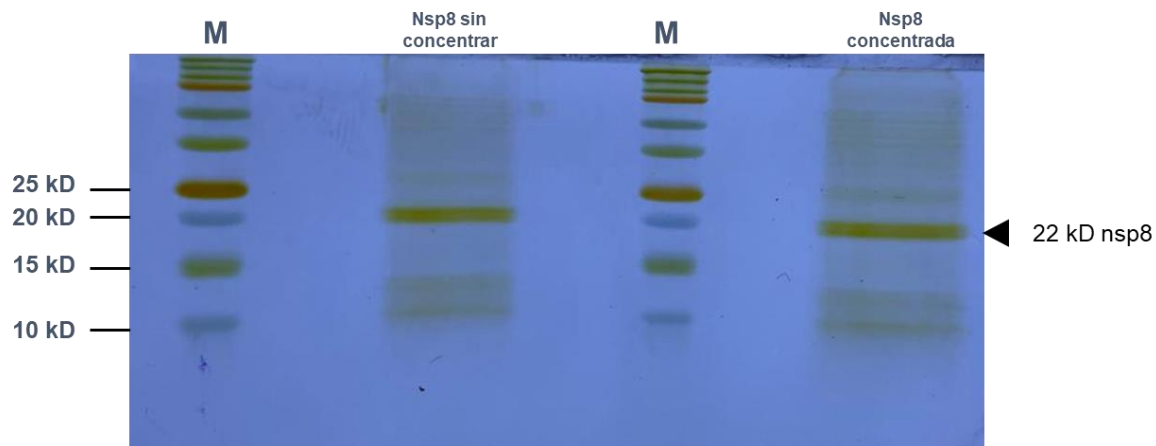


Figura 39: Tinción de plata para la identificación de nsp8 de SARS-CoV-2. M - marcador de peso molecular (1610374 Bio-Rad). Algunas de las bandas del marcador están marcadas con su tamaño en kDa

8. 15. Tinción de azul de Coomassie y de plata para nsp12 de SARS-CoV-2

En la Figura 40 se muestra el gel de SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie para las muestras de la proteína nsp12. En el carril 1 y 6 se cargó el marcador de peso molecular de 250 kD, para el carril 3 se colocó la muestra correspondiente a nsp12 purificada lote 1 no concentrada y en el carril 8 se colocó la muestra correspondiente a nsp12 lote 2 no concentrada. En el carril 3 se observa una banda tenue de aproximadamente 74 kD, mientras que en el carril 8 no se llegan a observar bandas visibles.

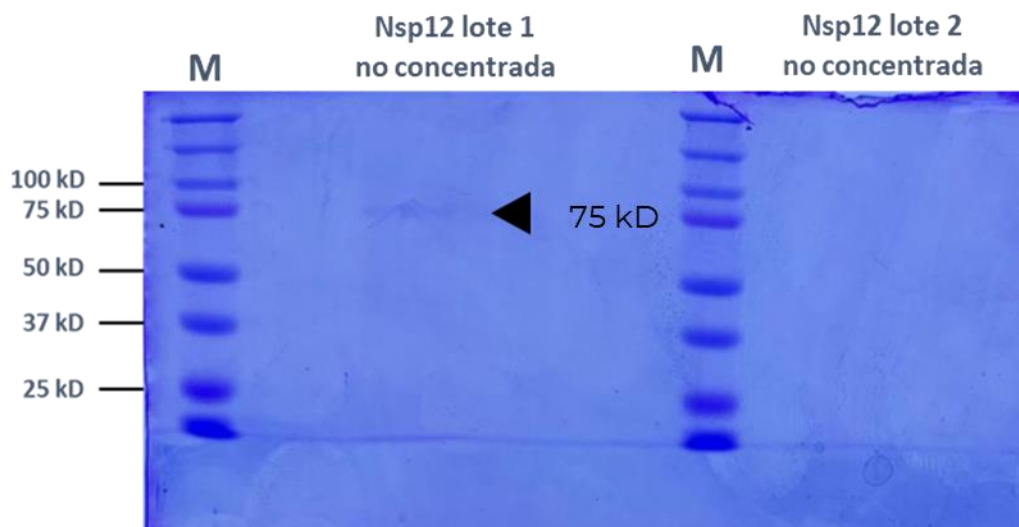


Figura 40: Tinción de Azul de Coomassie para la identificación de nsp12 de SARS-CoV-2. M – marcador de peso molecular (1610374 Bio-Rad). Algunas de las bandas del marcador están marcadas con su tamaño en kDa

En la Figura 41 se muestra el gel de SDS-PAGE con tinción de plata para las muestras de la proteína nsp12. En el carril 1 y 5 se cargó el marcador de peso molecular de 250 kD, para el carril 3 se colocó la muestra correspondiente a nsp12 purificada lote 1 no concentrada y en el carril 7 se colocó la muestra correspondiente a nsp12 purificada el día lote 2 no concentrada. En el carril 2 se observa una banda tenue de aproximadamente 74 kD, mientras que en el carril 7 no se llegan a observar bandas visibles.

Estas muestras fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad, para la muestra de nsp12 lote 2 se utilizó un gradiente creciente de imidazol como paso adicional de elución para mejorar la pureza de la muestra.

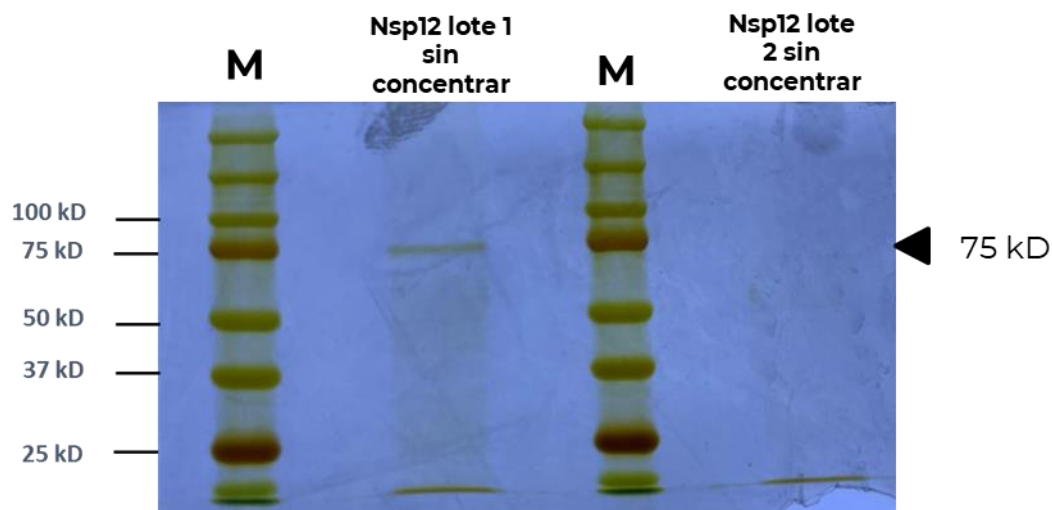


Figura 41: Tinción de plata para la identificación de nsp12 lote 1 y lote 2 sin concentrar de SARS-CoV-2

Se decidió volver a correr el gel SDS-PAGE de la muestra de nsp12 lote 1 pero en su forma concentrada. El gel fue teñido con tinción de plata, los resultados se muestran en la Figura 42, donde en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular de 250 kD, en el carril 3 la muestra de nsp12 de lote 1 en su forma concentrada donde se observa una banda intensa en el peso de 74 kD, así como también bandas 50 kD y 45 kD aproximadamente, pero desafortunadamente no se observan bandas en el peso esperado de 108 kD.

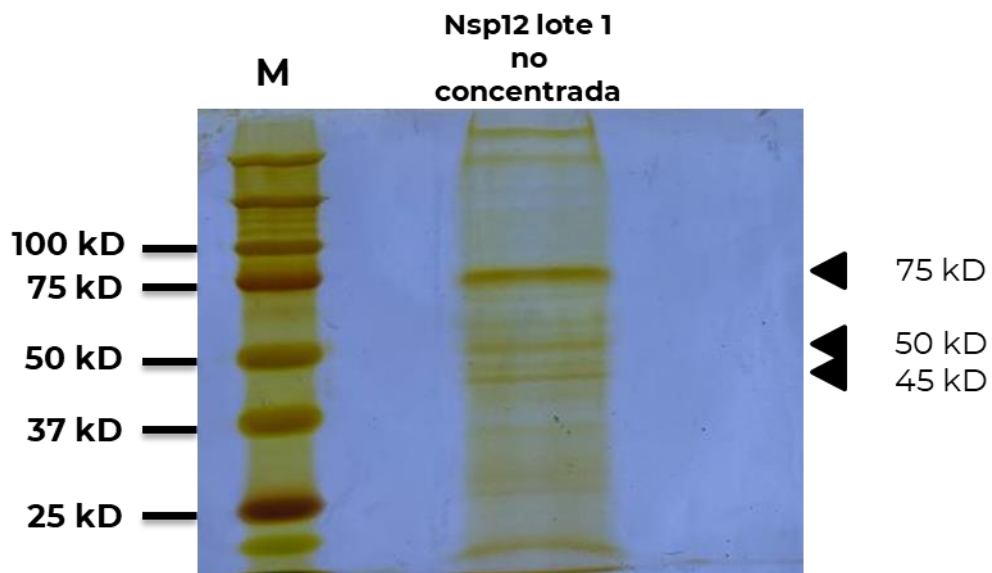


Figura 42: Tinción de plata para la identificación de nsp12 lote 1 de SARS-CoV-2

8. 16. Identificación de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12 de SARS-CoV-2 mediante *Western blot*

La identidad de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12 expresadas en células Expi293 fue evaluada mediante Western blot, utilizando un anticuerpo HRP Anti-6X His-tag (ab1187). Este enfoque permitió detectar específicamente las proteínas recombinantes, ya que las construcciones utilizadas contienen una etiqueta de hexahistidinas en el extremo C-terminal, incorporada para su identificación y purificación.

En la Figura 43 se presenta el análisis por *Western blot* de la proteína nsp7 purificada. En la muestra concentrada se detectó una banda intensa con un peso molecular aproximado de 10-11 kDa, consistente con el tamaño esperado para nsp7. Adicionalmente, se observaron bandas de mayor peso molecular (aproximadamente 16-18, 25 y 50 kDa), las cuales también fueron reconocidas por el anticuerpo anti-His. En la muestra sin concentrar, la banda correspondiente a nsp7 se detectó con menor intensidad, acompañada de señales adicionales de pesos moleculares similares. La presencia de estas bandas sugiere la coexistencia

de especies proteicas adicionales, posiblemente asociadas a formas oligoméricas, productos de degradación parcial o proteínas coeluidas durante la purificación por cromatografía de afinidad.

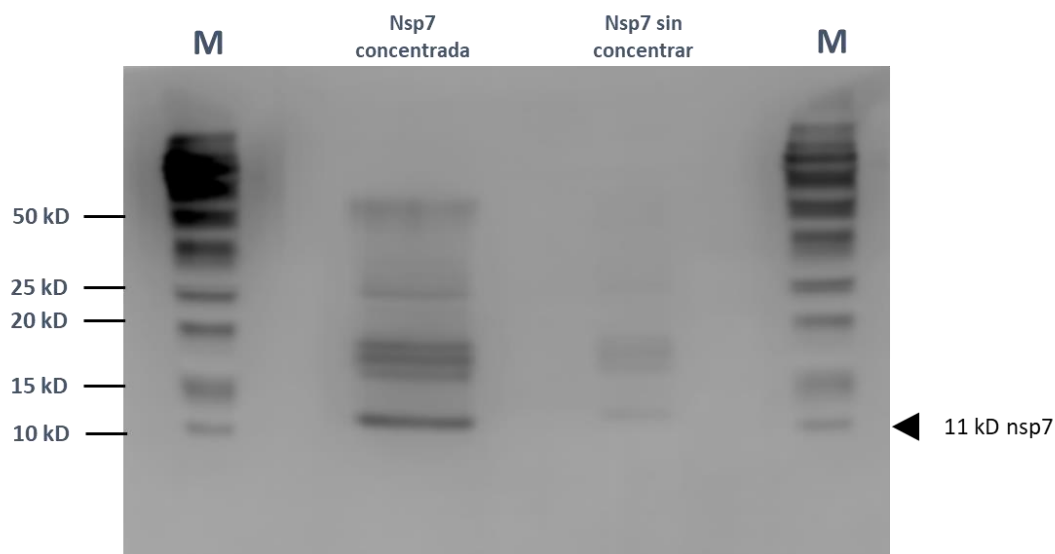


Figura 43: *Western blot* para la identificación de nsp7 de SARS-CoV-2

En la Figura 44 se muestra el análisis por *Western blot* de la proteína nsp8 purificada. En el carril 5 se colocó el marcador de peso molecular 250 kD, mientras que en el carril 1 se cargó la muestra de nsp8 su forma concentrada y en el carril 3 la misma muestra, pero sin concentrar. En el carril 1 y 3 se observan distintas bandas intensas en 22 kDa, que es el peso molecular esperado, así como también se observaron bandas intensas adicionales de distintos pesos moleculares en 10, 15 kDa y una banda más tenue en 40 kDa. De igual manera, estas muestras fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad, utilizando un gradiente creciente de imidazol como paso adicional de elución para mejorar la pureza de la muestra.

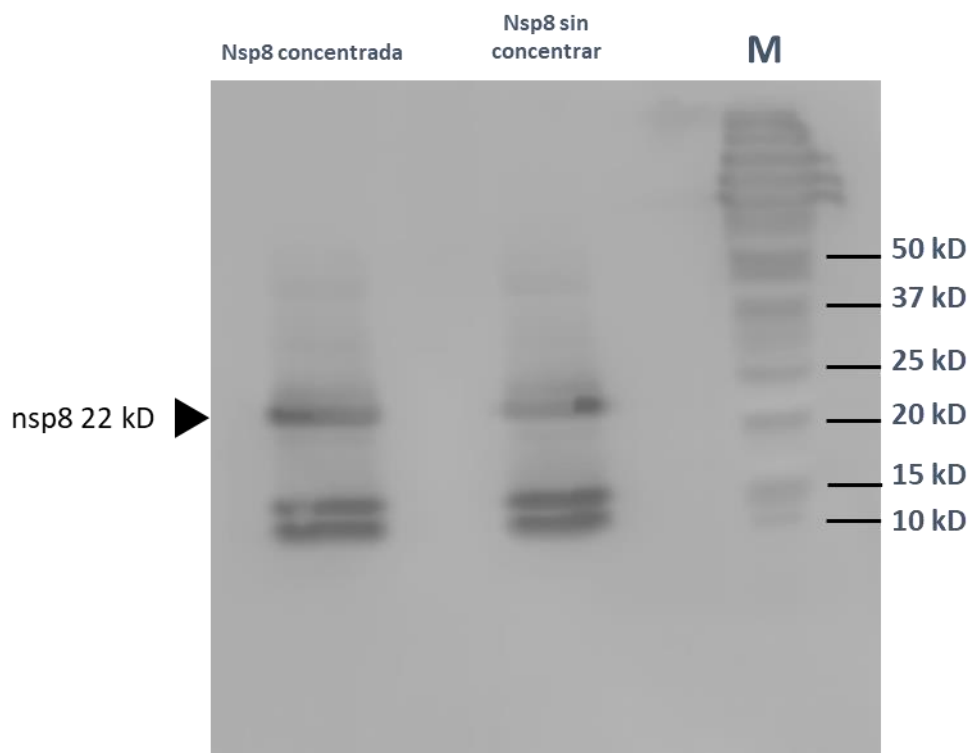


Figura 44: *Western blot* para la identificación de nsp8 de SARS-CoV-2

En la Figura 45 se muestra el análisis por *Western blot* de la proteína nsp12 lote 1. En el carril 1 se cargó la muestra de nsp12 lote 1 en su forma sin concentrar y en el carril 3 la misma muestra, pero concentrada, mientras que en el carril 4 se colocó se colocó el marcador de peso molecular de 250 kD. En el carril 1 no se observan bandas visibles. En el carril 5 se observan bandas tenues en el peso molecular esperado de 108 kD aproximadamente y una banda adicional en 75 kD. En este caso este lote 1 fue purificado mediante cromatografía de afinidad, sin utilizar un gradiente creciente de imidazol como paso adicional de elución.

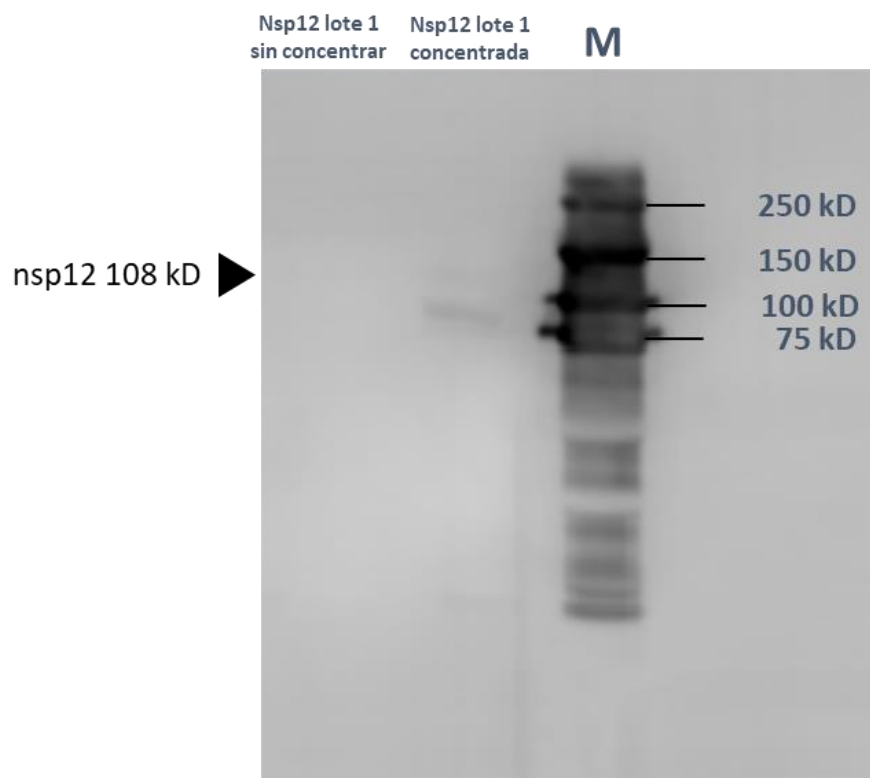


Figura 45: *Western blot* para la identificación de nsp12 lote 1 de SARS-CoV-2

En la Figura 46 se muestra el análisis por *Western blot* de la proteína nsp12 lote 2. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular 250 kD, mientras que en el carril 3 se cargó la muestra en su forma concentrada y en el carril 5 la misma muestra, pero sin concentrar. En los carriles 3 y 5 no se logran observar bandas visibles. Para este lote 2 fue purificado cromatografía de afinidad, utilizando un gradiente creciente de imidazol como paso adicional de elución para mejorar la pureza de la muestra.

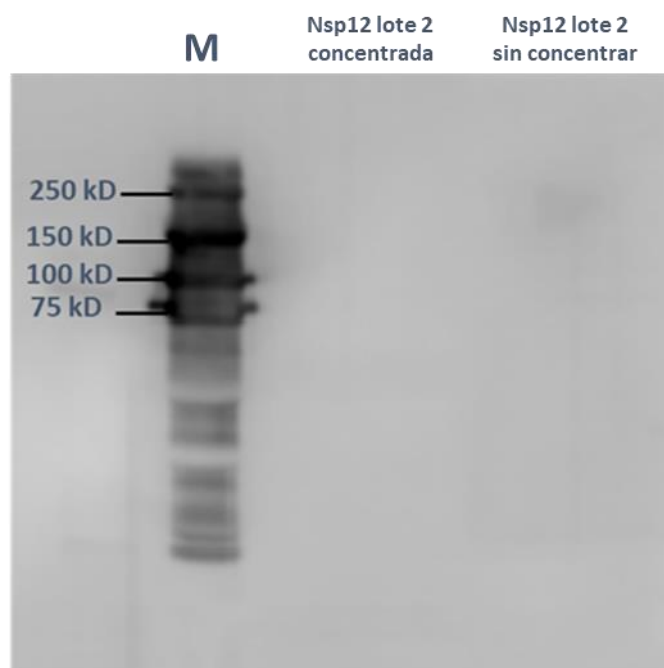


Figura 46: *Western blot* para la identificación de nsp12 lote 2 de SARS-CoV-2.

9. DISCUSIÓN

Este proyecto se enfocó en el análisis de elementos clave que están involucrados en la replicación de SARS-CoV-2, de manera específica en la conservación y la dinámica estructural del FSE, así como la evaluación del complejo de RdRp de SARS-CoV-2. Los resultados obtenidos permiten discutir la relevancia funcional de estos componentes y su posible impacto en el desarrollo de estrategias antivirales. En este contexto, el análisis comparativo del FSE arrojó un porcentaje de conservación del 52.42% para los tres betacoronavirus (Figura 12), siendo MERS-CoV el que tiene más variación con respecto a los coronavirus responsables del síndrome respiratorio agudo grave, esto sugiere que su mecanismo está conservado pero su secuencia específica evolucionó de forma distinta en este linaje. El porcentaje de conservación entre SARS-CoV y SARS-CoV-2 es relativamente alto, de 92.37%, esto es típico para regiones que son funcionales y poseen poca variabilidad evolutiva. El sitio deslizante UUUAAC se conserva en MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2. Aunque se observan variaciones puntuales en la horquilla atenuadora y el pseudonudo de tres tallos, estas no afectan su estabilidad ni la eficiencia del cambio de marco para cada betacoronavirus, lo que sugiere una conservación funcional robusta del elemento -1PRF entre los betacoronavirus (Kelly, N. Olson, et al., 2020; Kelly, Woodside, et al., 2020; Yan et al., 2023)

De acuerdo con el análisis con dos diferentes programas, en las Figuras 13 y 14, respecto a la estructura del FSE, se puede observar un asa en el sitio deslizante en ambas figuras, esto facilita el deslizamiento y acomodo del ribosoma en el sitio espaciador, el cual no mantiene ningún tipo de estructura secundaria. Probablemente en el movimiento natural del virus en el -1PRF la estructura de asa en el sitio deslizante tiende a extenderse para poder hacer el movimiento del -1 nucleótido hacia atrás. El pseudonudo de tres tallos no se puede visualizar como tal en Varna, pero da una idea de la presencia del pseudonudo por los tallos y horquillas apilados uno sobre otro en ambas figuras. Estos tallos se observan bien definidos, lo cual podría ser a que es una estructura estable. En la visualización de x3DNADSSR se observan líneas azules diagonales las cuales son interacciones no canónicas, es decir, interacciones que no siguen las leyes de Watson y Crick, las

cuales son purinas con purinas y pirimidinas con pirimidinas. Esto suele ser común en estructuras como los pseudonudos. El ARN en la naturaleza tiende a adoptar estructuras secundarias dinámicas (Kelly, N. Olson, et al., 2020; Pekarek et al., 2022; Trinity et al., 2023).

La dinámica molecular del FSE en SARS-CoV-2 muestra que no es una estructura rígida y puede adoptar múltiples conformaciones durante escalas de tiempo simuladas (Figura 15). En las simulaciones se llega a observar que el pseudonudo muestra una estabilidad interna mediante interacciones con sus mismos nucleótidos, pero también se tiene cierta plasticidad en la molécula. Esto se debe a que hay momentos en que ocurre el desemparejamiento de nucleótidos y compactación de la molécula en cuestión de microsegundos. Algunos estudios muestran que la dinámica molecular y las simulaciones del FSE en SARS-CoV-2 puede tener distintos caminos en la transición de conformaciones del pseudonudo, estos cambios son cruciales para la función de este dominio en el mecanismo del cambio de marco ribosomal -1 nucleótido (He et al., 2023; Peterson et al., 2024; Yan et al., 2022; Yan & Schlick, 2025).

La horquilla atenuadora que está ubicada en el extremo 5' del sitio deslizante, se ha relacionado con la modulación en la eficiencia del -1PRF; con esto la maquinaria del ribosoma se pausa o se desliza únicamente un nucleótido. El autoapareamiento progresivo y alteración estructural parcial en esta región pueden coincidir con predicciones de que la horquilla atenuadora podría modular la disposición y accesibilidad de las otras regiones reguladoras, afectando indirectamente el plegamiento y la estabilidad del pseudonudo e incluso del sitio deslizante. La flexibilidad que se llega a observar en la horquilla atenuadora como en el espaciador puede contribuir a la eficiencia y lo preciso que puede ser el -1PRF, esto permite ajustes estructurales en respuesta a las tensiones mecánicas que son aplicadas por el mismo ribosoma durante la traducción (Kelly, N. Olson, et al., 2020; Neupane et al., 2021; Yan et al., 2022).

La molécula de ARN del FSE puede alternar entre distintos estados conformacionales, que incluyen estructuras compactas y regiones transitoriamente

desemparejadas. Esta dinámica estructural refleja la plasticidad intrínseca de la molécula y sustenta los cambios conformacionales implicados en el mecanismo del -1PRF de los betacoronavirus. La comprensión de estas transiciones estructurales es fundamental para el desarrollo de potenciales inhibidores, ya que podría orientar el diseño de nuevos fármacos capaces de interferir con la replicación viral (Neupane et al., 2021; Peterson et al., 2024; Yan et al., 2022; Yan & Schlick, 2025).

En otro orden de ideas y considerando que, hasta el momento, los estudios disponibles no han identificado mutaciones específicas en nsp12 asociadas con resistencia a otros antivirales como molnupiravir, el análisis de marcadores de resistencia se centró en el remdesivir.

Estos marcadores fueron identificados en las secuencias analizadas del continente americano (Tabla 14) y mostraron una distribución heterogénea entre los países evaluados. En Ecuador, se identificó el marcador de resistencia N198S en una de las dos secuencias analizadas con ORF1ab, lo que corresponde al 50% de su presencia; sin embargo, este valor debe interpretarse con cuidado debido al tamaño de la muestra. En Brasil, que es el país con el mayor número de secuencias analizadas (17,255), se detectaron 10 secuencias con el marcador A97V, lo que representa un 0.057%, así como una única secuencia con el marcador E802D, que corresponde a un 0.0057%. Es probable que la mayor detección de los marcadores en Brasil esté relacionada con la disponibilidad de secuencias depositadas en GenBank, esto asociado a la vigilancia epidemiológica realizada tras la emergencia de la variante Gamma en enero del 2021 (Faria et al., 2021).

La mutación A97V se encuentra en una región N-terminal de la RdRp de SARS-CoV-2, cerca de lo que es el dominio N-NiRAN de la estructura general de la proteína. Estudios de dinámica molecular muestran que la mutación A97V no afecta de manera significativa la unión de remdesivir a la RdRp de SARS-CoV-2. La mutación N198S está cerca de la región N-terminal de nucleotidil transferasa, la cual es la encargada de incorporar los nucleótidos a la cadena de ARN naciente. Esto podría disminuir la eficacia del fármaco, interfiriendo con el mecanismo de acción al

ser un análogo de nucleósido (Gao et al., 2020; Hillen et al., 2020; Mohammad et al., 2021; Park et al., 2022; Stevens et al., 2022)

El residuo E802 se encuentra en el subdominio de la palma, que es muy cercano al centro catalítico en la síntesis de ARN, ya que estabiliza el bucle involucrado en la unión del ARN naciente mediante interacciones con los residuos D804 y K802. Existe un mecanismo propuesto donde se establece que la mutación E802D altera las interacciones de las cadenas laterales de los aminoácidos induciendo cambios estructurales. Se cree que esta modificación impacta la unión del nucleótido +3 (nt+3) cuando se está sintetizando el ARN, esto permite la continuidad de la síntesis aún después de la incorporación de la forma activa de remdesivir. En un reporte clínico de una paciente inmunocomprometida con deficiencia adquirida de células B que desarrolló una infección prolongada por SARS-CoV-2, se identificó la mutación E802D en la RdRp de SARS-CoV-2, la cual no estaba presente en las muestras previa al tratamiento. Los experimentos demostraron que estas mutaciones confieren un aumento de seis veces en la IC₅₀ de remdesivir (Batoool et al., 2025; Focosi et al., 2022; Gandhi et al., 2022; Szemiel et al., 2021).

En estudios in vitro se ha observado desarrollo de resistencia a remdesivir, con incrementos de entre 2.7 y 10.4 veces después de múltiples pasajes en presencia de concentraciones crecientes del fármaco. Se han determinado marcadores de resistencia como S759A y V792I que están localizados en el sitio catalítico de la RdRp de SARS-CoV-2. La combinación de estas dos mutaciones llevó a una resistencia de hasta 38 veces a remdesivir. Existe el caso de un paciente inmunosuprimido con insuficiencia respiratoria causada por neumonía intersticial que se sometió a trasplante de pulmón izquierdo y posteriormente contrajo COVID-19 por la variante ómicron BA.5, siendo un paciente que no logra eliminar completamente el virus del organismo. Los análisis de secuenciación del genoma completo mostraron la aparición de varias mutaciones virales asociadas al tratamiento por remdesivir. Se encontró la mutación C799F en la RdRp de SARS-CoV-2 y esta mutación impedía la entrada de remdesivir-trifosfato en el sitio activo de la polimerasa (Igari et al., 2024; Stevens et al., 2022).

Aunque las tres secuencias en las que se encontraron marcadores de resistencia en la posición S759, en el presente trabajo, no coinciden con las mutaciones previamente descritas en la literatura, la presencia de estas sustituciones de aminoácidos en la región merece atención, esto es debido a que la posición S759 se localiza cerca del sitio catalítico de la RdRp de SARS-CoV-2. Alteraciones en esta zona podrían modificar la interacción de remdesivir con el sitio activo reduciendo la capacidad de inhibir del antiviral. Por esto, es importante el monitoreo continuo de estas variaciones por su posible impacto en la eficacia del tratamiento antiviral y evitar la emergencia de cepas resistentes (Batool et al., 2025; Stevens et al., 2022).

Hasta el momento, no existen informes que describan de manera sistemática la resistencia a remdesivir en SARS-CoV-2 a escala global. La literatura disponible se ha centrado principalmente en la caracterización funcional de mutaciones localizadas en la subunidad catalítica nsp12, así como en estudios in vitro que evalúan los cambios en la susceptibilidad viral al fármaco. Está limitada disponibilidad de información dificulta el establecimiento de tendencias sobre la distribución global de marcadores de resistencia en la RdRp de SARS-CoV-2 y pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios genómicos a gran escala que permitan evaluar la emergencia y prevalencia de variantes asociadas con resistencia a remdesivir. En este contexto, el presente análisis resulta relevante, ya que aporta información que contribuye a la evaluación de los niveles de resistencia a este antiviral. No obstante, es importante señalar que el análisis aún no incluye la totalidad de las secuencias disponibles del continente americano, debido a que resta completar la evaluación del mayor conjunto de secuencias, correspondiente a Estados Unidos, cuya incorporación constituye una perspectiva de corto plazo para este trabajo.

En relación con la ingeniería de vectores de expresión, diversos estudios han empleado el vector pcDNA3.1 como un sistema confiable para la expresión de proteínas recombinantes en células eucariotas. En este contexto, el uso del promotor de CMV y de la secuencia Kozak favoreció una traducción eficiente en

células Expi293. Asimismo, la adición de un péptido señal en el extremo N-terminal permitió dirigir la síntesis proteica hacia el retículo endoplásmico, promoviendo su adecuado procesamiento y plegamiento. Finalmente, la incorporación de una etiqueta de hexahistidinas facilitó tanto la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad como su detección por Western blot (Eydoux et al., 2020; Parvathy et al., 2021; Zhao et al., 2021).

Durante el desarrollo experimental, las muestras de proteína obtenidas en el laboratorio fueron transportadas del CIAD, en Hermosillo, Sonora, al CIBIOR, en Atlixco, Puebla, proceso durante el cual estuvieron expuestas a ciclos de congelación y descongelación. Este factor es relevante para interpretar los rendimientos obtenidos y la aparición de productos adicionales observados en los análisis posteriores.

Los rendimientos totales obtenidos tras la purificación de las proteínas nsp7, nsp8 y nsp12 evidenciaron una eficiencia variable en el proceso. No obstante, en general se logró recuperar una cantidad suficiente de proteína para establecer en el corto plazo algunos ensayos funcionales, como estudios cinéticos. Estos resultados, sin embargo, también ponen de manifiesto la necesidad de optimizar etapas clave del protocolo, particularmente las condiciones de expresión y purificación en cultivo celular, tal como se ha señalado en estudios previos (AseBio, 2020; Madru et al., 2021).

En el caso de la proteína nsp7, se recuperaron 289.6 µg a partir de tres reacciones de purificación, un rendimiento comparable con lo reportado para proteínas no estructurales de coronavirus, donde típicamente se obtienen entre 100 y 500 µg por lote en sistemas de expresión bacterianos o eucariotas. La consistencia observada en las fracciones eluidas por reacción sugiere una elución relativamente estable de la proteína. De manera similar, la purificación de nsp8 produjo un rendimiento total de 309.6 µg en una sola reacción, distribuido en seis fracciones eluidas. Este valor, superior al obtenido para nsp7 y nsp12, podría atribuirse a una mayor solubilidad intrínseca de nsp8, y se encuentra en concordancia con reportes donde esta

proteína alcanza concentraciones de entre 100 y 200 µg tras la purificación (AseBio, 2020; Dangerfield et al., 2021).

En contraste, la proteína nsp12 mostró una marcada variabilidad entre lotes. Mientras que el lote 1 presentó un rendimiento elevado de 1.85 mg, en el lote 2 únicamente se recuperaron 67.8 µg tras cuatro reacciones de purificación. Esta diferencia podría explicarse, al menos en parte, por el uso de un gradiente de elución en el lote 2, lo que habría provocado una dilución excesiva de la proteína. Adicionalmente, se ha reportado que nsp12 es particularmente susceptible a procesos de degradación proteolítica e insolubilización, alcanzando rendimientos superiores a 1 mg/l de cultivo únicamente bajo condiciones optimizadas, como la coexpresión con chaperonas moleculares (Dangerfield et al., 2021; Ecker et al., 2020; Madru et al., 2021).

En conjunto, los rendimientos obtenidos para nsp7, nsp8 y nsp12 (lote 1) se encuentran dentro de los rangos reportados para proteínas virales expresadas en sistemas eucariotas, aunque se resalta la necesidad de optimar específicamente las condiciones de expresión y purificación de nsp12.

Para la identificación de las proteínas expresadas, se realizaron tinciones con Coomassie y con plata. Debido a la baja concentración proteica presente en algunas alícuotas, la tinción con Coomassie resultó insuficientemente sensible, en contraste con la tinción de plata, que permitió detectar cantidades menores de proteína. Esta diferencia es consistente con los rangos de detección reportados para ambas técnicas, donde la tinción de plata permite detectar entre 2 y 5 ng por banda, mientras que Coomassie requiere entre 5 y 25 ng (QIAGEN, 2025; Sasse & Gallagher, 2009). Esto explica la presencia de pocas o nulas bandas observadas en las Figuras 36, 38 y 40.

En las Figuras 37 y 43, correspondientes a la tinción de plata y al Western blot de nsp7, se detectó la banda esperada de aproximadamente 11 kDa, junto con bandas adicionales de mayor peso molecular. Estas bandas podrían corresponder a agregados proteicos generados por desnaturalización parcial. De manera similar, en las Figuras 39 y 44, correspondientes a nsp8, se observó la banda esperada de

22 kDa, además de bandas de menor y mayor peso molecular, lo cual sugiere posibles procesos de degradación proteica y formación de complejos oligoméricos.

En el caso de nsp12 (Figuras 41, 42 y 45), la tinción de plata reveló predominantemente una banda intensa alrededor de 75 kDa, inferior al peso molecular esperado de 108 kDa, mientras que en el Western blot se logró detectar una banda tenue cercana al peso esperado. Esto sugiere un alto grado de degradación proteica. Adicionalmente, para el lote purificado mediante gradiente no se detectaron bandas visibles (Figura 46), a diferencia del lote purificado sin gradiente (Figura 45), lo que refuerza la hipótesis de una dilución excesiva durante la elución. En este contexto, sería recomendable producir entre tres y cinco lotes adicionales de expresión para alcanzar concentraciones adecuadas de esta proteína.

La presencia de bandas adicionales observadas en los análisis electroforéticos y de inmunodetección puede atribuirse a la formación de agregados proteicos o a procesos de degradación. Durante la desnaturalización, la exposición de regiones hidrofóbicas favorece interacciones intermoleculares no específicas, lo que conduce a la asociación de monómeros y a la formación de agregados. Este fenómeno es frecuente en proteínas que contienen dominios hidrofóbicos, como nsp7, nsp8 y nsp12 de SARS-CoV-2 (Amani & Naeem, 2013; Dill et al., 2008).

El transporte de las muestras entre ciudades, con al menos tres ciclos de congelación y descongelación y sin un control estricto de temperatura, probablemente contribuyó de manera significativa a la degradación proteica y a la formación de complejos agregados. Una estrategia para minimizar estos efectos sería implementar el sistema de purificación directamente en el laboratorio CIBIOR, así como almacenar las muestras en alícuotas inmediatamente a -80 °C tras su purificación y concentración. Asimismo, sería conveniente repetir los ensayos de tinción de plata y *Western blot* incluyendo muestras del sobrenadante previo a la purificación y fracciones intermedias, con el fin de evaluar la eficiencia de cada etapa del proceso.

Finalmente, estudios previos han demostrado que las proteínas de SARS-CoV y SARS-CoV-2 presentan una alta propensión a la agregación, ya que todas las proteínas virales, tanto estructurales como no estructurales, contienen al menos una región susceptible a este fenómeno (Bhardwaj et al., 2023). Además, se ha reportado que bandas adicionales observadas en SDS-PAGE que no se detectan posteriormente por Western blot, particularmente en el caso de nsp12, corresponden a fragmentos degradados, contaminantes o migraciones anómalas dependientes del plegamiento proteico o de las condiciones experimentales empleadas durante la producción de proteínas recombinantes (Bai et al., 2022; Min et al., 2021; Velthuis et al., 2009).

En conjunto, los resultados obtenidos en la expresión y purificación de nsp7, nsp8 y nsp12 constituyen un punto de partida relevante para estudios posteriores sobre la maquinaria replicativa de SARS-CoV-2. Estas proteínas forman parte de la RdRp, por lo que su disponibilidad en forma recombinante resulta fundamental para explorar su interacción, ensamblaje y actividad en condiciones controladas. Si bien los rendimientos y la estabilidad observados, particularmente para nsp12, evidencian la necesidad de optimar las condiciones de expresión y purificación, las cantidades recuperadas permiten plantear, en el corto plazo, ensayos dirigidos a la caracterización funcional y cinética de estas proteínas, de manera individual y en complejo. Asimismo, el establecimiento de este sistema experimental abre la posibilidad de emplearlo como modelo bioquímico para la evaluación de compuestos con potencial actividad antiviral, contribuyendo a estudios orientados a la identificación y caracterización de nuevos inhibidores dirigidos contra la RdRp de SARS-CoV-2.

10. PERSPECTIVAS

- Diseñar un inhibidor para la región del FSE correspondiente al -1 PRF *in silico*.
- Analizar los marcadores de resistencia en las secuencias de Estados Unidos abarcando todo el continente americano.
- Evaluar la actividad enzimática del complejo nsp7-nsp8-nsp12 bajo diferentes condiciones experimentales optimizando el sistema *in vitro*.
- Utilizar un inhibidor autorizado por la FDA de la RdRp de SARS-CoV-2, como remdesivir, en el complejo de nsp7-nsp8-nsp12 para validar el sistema de ensayo en la actividad enzimática.
- Evaluar nuevos inhibidores no autorizados, distintos a los fármacos aprobados, para identificar moléculas alternativas con potencial efecto inhibitorio sobre el complejo de la RdRp de SARS-CoV-2.
- Ampliar el modelo con la inclusión de otras proteínas como la nsp13 o nsp14, con el fin de aproximarse a un sistema más representativo al contexto viral
- Aplicar esta metodología a coronavirus emergentes, contribuyendo con el diseño de estrategias terapéuticas.

11. CONCLUSION

Este estudio demostró la conservación genética y probablemente funcional del dominio FSE en betacoronavirus, con énfasis en SARS-CoV-2. También se evaluó la presencia de marcadores de resistencia de la RdRp en SARS-CoV-2, observándose una baja prevalencia de estas mutaciones en las secuencias analizadas, lo que indica que, hasta el momento, no existe evidencia de una emergencia relacionada con resistencia a remdesivir; sin embargo, se resalta la importancia de mantener una vigilancia genómica continua.

Por otro lado, se logró la construcción, verificación y expresión de los plásmidos pcDNSP7, pcDNSP8 y pcDNSP12, permitiendo la obtención de las proteínas recombinantes nsp7, nsp8 y nsp12 de SARS-CoV-2 en un sistema de expresión eucariota. La purificación por cromatografía de afinidad permitió recuperar cantidades suficientes de nsp7 y nsp8, mientras que nsp12 presentó mayor variabilidad en rendimiento y estabilidad, lo que indica la necesidad de optimizar las condiciones de expresión y purificación para esta proteína.

Estos resultados apoyan la relevancia de integrar enfoques bioinformáticos y experimentales para el estudio de mecanismos de regulación de la replicación viral y de la susceptibilidad a antivirales, así como para el establecimiento de modelos experimentales que contribuyan al desarrollo y evaluación de nuevas estrategias terapéuticas contra SARS-CoV-2.

12. REFERENCIAS:

Abcam. (2002). *HRP Anti-6X His tag® antibody, ab1187*. <https://doi.org/Abcam>

Alhamlan, F. S., & Al-Qahtani, A. A. (2025). Variants: Genetic Insights, Epidemiological Tracking, and Implications for Vaccine Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(1263), 1-24. <https://doi.org/10.3390/ijms26031263>

Amani, S., & Naeem, A. (2013). Understanding protein folding from globular to amyloid state Aggregation: Darker side of protein. *Process Biochemistry*, 48(11), 1651-1664. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.08.011>

Applied Biological Materials Inc. (2016). *MegaFi™ Pro Fidelity DNA Polymerase Cat. No. G886*. [https://doi.org/Applied Biological Materials Inc.](https://doi.org/Applied%20Biological%20Materials%20Inc)

Arandia-Guzmán, J., & Antezana-Llaveta, G. (2020). SARS-CoV-2: Estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. *Gac Med Bol*, 43(2), 170-178. <https://doi.org/0000-0003-3741-8817>

Arevalo, S., Castillo-Chávez, A., & Uribe, C. (2023). What do we know about the function of SARS-CoV-2 proteins? *Frontiers*, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1249607>

AseBio. (2020). *Optimiza la purificación de proteínas recombinantes del SARS-CoV-2*. AseBio. Recuperado de <https://www.asebio.com/actualidad/prensa/optimiza-la-purificacion-de-proteinas-recombinantes-del-sars-cov-2>

Bahar, M. A., Kusuma, I. Y., Visnyovszki, Á., & Hajdú, E. (2024). Favipiravir does not improve viral clearance in mild to moderate COVID-19—A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Heliyon*, 10(9), 1-15. <https://doi.org/doi:10.1016/j.heliyon.2024.e29808>

Bai, X., Sun, H., Wu, S., Li, Y., Wang, L., & Hong, B. (2022). Identifying Small-Molecule Inhibitors of SARS-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase by Establishing a Fluorometric Assay. *Frontiers in Immunology*, 13(844749), 1-12. <https://doi.org/doi:10.3389/fimmu.2022.844749>

Batool, S., Chokkakula, S., Jeong, J. H., Baek, Y. H., & Song, M.-S. (2025). SARS-CoV-2 drug resistance and therapeutic approaches. *Cell Press*, 11(2), 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e41980>

Carballal, G., & Oubiña, J. R. (2014). *Virología médica* (4ta ed.). Corpus Libros Médicos y Científicos.

Chaguza, C., Hahn, A. M., Petrone, M. E., Swanstrom, R. I., Roberts, S. C., & Grubaugh, N. D. (2023). Accelerated SARS-CoV-2 intrahost evolution leading to distinct genotypes during chronic infection. *Cell Reports Medicine*, 4(100943), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.100943>

Chan, J. F.-W., Yuan, S., Chu, H., Sridhar, S., & Yuen, K.-Y. (2024). COVID-19 drug discovery and treatment options. *Nature Review Microbiology*, 22, 391-407. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01036-y>

Chang, K.-C., Salawu, E. O., Chang, Y.-Y., & Wen, J.-D. (2019). Resolution-exchanged structural modeling and simulations jointly unravel that subunit rolling underlies the mechanism of programmed ribosomal frameshifting. *Bioinformatics*, 35(6), 945-952. <https://doi.org/doi: 10.1093/bioinformatics/bty762>. PMID: 30169551.

Chang, K.-C., & Wen, J.-D. (2021). Programmed -1 ribosomal frameshifting from the perspective of the conformational dynamics of mRNA and ribosomes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19(2021), 3580-3588. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.06.015>

Cytiva. (2020a). *ÄKTA pure™ Operating Instructions 29022997 AL*. <https://doi.org/Cytiva>

Cytiva. (2020b). *HisTrap™ HP column, 1 ml and 5 ml 71502768 AL*. <https://doi.org/Cytiva>

Dangerfield, T. L., Huang, N. Z., & Johnson, K. A. (2021). Expression and purification of tag-free SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase in Escherichia coli. *STAR Protoc*, 2(1), 1-15. <https://doi.org/doi: 10.1016/j.xpro.2021.100357>

Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S., & Weikl, T. R. (2008). The Protein Folding Problem. *Annu Rev Biophys*, 37, 289-316.

Ecker, J., Kirchenbaum, G., & Pierce, S. (2020). *High-Yield Expression and Purification of Recombinant Influenza Virus Proteins from Stably-Transfected Mammalian Cell Lines*. 8(492), 1-20.

Eydoux, C., Fattorini, V., & Shannon, A. (2020). A fluorescence-based high throughput-screening assay for the SARS-CoV RNA synthesis complex. *Science Direct*, 288, 1-7.

Faria, N. R., Claro, I. M., Candido, D., & Franco, L. A. M. (2021). *Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: Preliminary findings*. *Virological*. <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manauas-preliminary-findings/586>

Fields, B. N., Knipe, David M, & Howley, Peter M. (2013). *Virology: Vol. uno*. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.

Focosi, D., Maggi, F., McConnell, S., & Casadevall, A. (2022). Very low levels of remdesivir resistance in SARS-COV-2 genomes after 18 months of massive usage during the COVID19 pandemic: A GISAID exploratory analysis. *Antiviral Research, Elsevier*, 198(105247), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105247>

Gandhi, S., Klein, J., Robertson, A. J., Peña-Hernández, M. A., Lin, M. J., & Roychoudhury, P. (2022). De novo emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient: A case report. *Nature Communications*, 13(1547), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29104-y>

Gao, Y., Yan, L., & Huang, Y. (2020). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science Direct*, 368, 779-782.

He, W., Emeterio, J. S., Woodside, M. T., Kirmizialtin, S., & Pollack, L. (2023). Atomistic structure of the SARS-CoV-2 pseudoknot in solution from SAXS-driven

molecular dynamics. *Nucleic Acids Research*, 51, 11332-11344. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad809>

Hillen, H. S., Kokic, G., & Farnung, L. (2020). Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature*, 584, 154-156.

Hu, H.-T., Cho, C.-P., Lin, Y.-H., & Chang, K.-Y. (2015). A general strategy to inhibiting viral -1 frameshifting based on upstream attenuation duplex formation. *Nucleic Acids Research*, 44(1), 256-266. <https://doi.org/doi: 10.1093/nar/gkv1307>

Hycult biotech. (2010). *SODIUM DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE)*. <https://doi.org/Hycult Biotech>

Igari, H., Sakao, S., Ishige, T., Saito, K., & Murata, S. (2024). Dynamic diversity of SARS-CoV-2 genetic mutations in a lung transplantation patient with persistent COVID-19. *Nature Communications*, 15(3604), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47941-x>

IMPLEN. (2012). *NanoPhotometer® NP80/N60/N50/C40 User Manual*. 10. <https://doi.org/IMPLEN>

Jamison Jr., D. A., Narayanan, S. A., Trovão, N. S., Guarnieri, Joseph W., & Beheshti, A. (2022). A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection. *Springer Nature*, 30, 889-898. <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01108-8>

Kandwal, S., & Fayne, D. (2023). Genetic conservation across SARS-CoV-2 non-structural proteins – Insights into possible targets for treatment of future viral outbreaks. *Virology*, 581, 97-115. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.02.011>

Karousis, E. D., Schubert, K., & Ban, N. (2024). Coronavirus takeover of host cell translation and intracellular antiviral response: A molecular perspective. *The EMBO Journal*, 43(2), 151-167.

Kathiravan, M. K., Radhakrishnan, S., Namasivayam, V., & Palaniappan, S. (2021). An Overview of Spike Surface Glycoprotein in Severe Acute Respiratory Syndrome–

Coronavirus. *Molecular Diagnostics and Therapeutics*, 8(637550), 2-18.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.637550>

Kelly, J. A., N. Olson, A., Neupane, K., Munshi, S., & San Emeterio, J. (2020). Structural and functional conservation of the programmed -1 ribosomal frameshift signal of SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J. Biol. Chem.*, 295(31), 10741-10748.
<https://doi.org/10.1074/jbc.AC120.013449>

Kelly, J. A., Woodside, M. T., & Dinman, J. D. (2020). Programmed -1 Ribosomal Frameshifting in coronaviruses: A therapeutic target. *Virology, Elsevier*, 554(2021), 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.12.010>

Khor, S.-S. (2025). New Trends in SARS-CoV-2 Variants and Vaccines. *Vaccines*, 13(265), 1-3.

Li, X., Zhang, L., Chen, S., Ouyang, H., & Ren, L. (2021). Possible Targets of Pan-Coronavirus Antiviral Strategies for Emerging or Re-Emerging Coronaviruses. *Microorganisms*, 9(1479), 1-16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071479>

Lopez, U. M., Hasan, Md. M., Havranek, B., & Islam, S. M. (2024). SARS-CoV-2 Resistance to Small Molecule Inhibitors. *Current Clinical Microbiology Reports*, 11, 127-139. <https://doi.org/10.1007/s40588-024-00229-6>

Machida, K., Tanaka, R., Miki, S., & Nosedá, S. (2024). High-Throughput Screening for a SARS-CoV-2 Frameshifting Inhibitor Using a Cell-Free Protein Synthesis System. *BioTechniques*, 76(4), 161-168. <https://doi.org/10.2144/btn-2023-0102>

Madru, C., Tekpinar, A. D., Rosario, S., & Delarue, M. (2021). Fast and efficient purification of SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase complex expressed in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 16(4), 1-12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250610>

Malone, B., Urakova, N., Snijder, E. J., & Campbell, E. A. (2022). Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS- CoV-2 drug design. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 23, 21-39.

Manabe, T., Kambayashi, D., Akatsu, H., & Kudo, K. (2021). Favipiravir for the treatment of patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 21(489), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06164-x>

Markov, P., Ghafari, M., & Beer, M. (2023). The evolution of SARS-CoV-2. *Nature*, 21, 361-379. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00878-2>

Merck Millipore Ltd. (2014). *Filtros para centrifuga Amicon® Ultra-15 10K, UFC901008, UFC901024, UFC901096*. [https://doi.org/Merck Millipore Ltd](https://doi.org/Merck%20Millipore%20Ltd)

Min, J. S., Kwon, S., & Jin, Y.-H. (2021). SARS-CoV-2 RdRp Inhibitors Selected from a Cell-Based SARS-CoV-2 RdRp Activity Assay System. *Biomedicines*, 9(996), 1-14. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080996>

Mohammad, A., Al-Mulla, F., Wei, D.-Q., & Abubaker, J. (2021). Remdesivir MD Simulations Suggest a More Favourable Binding to SARS-CoV-2 RNA Dependent RNA Polymerase Mutant P323L Than Wild-Type. *Biomolecules*, 11(919), 1-15. <https://doi.org/10.3390/biom11070919>

Neupane, K., Zhao, M., Lyons, A., Munshi, S., Ileperuma, S. M., Ritchie, D. B., Hoffer, N. Q., Narayan, A., & Woodside, M. T. (2021). Structural dynamics of single SARS-CoV-2 pseudoknot molecules reveal topologically distinct conformers. *Nature Communications*, 12(4749), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25085-6>

Padhi, A. K., Dandapat, J., Saudagar, P., Uversky, V. N., & Tripathi, T. (2021). Interface-based design of the favipiravir-binding site in SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase reveals mutations conferring resistance to chain termination. *Federation of European Biochemical Societies*, 595, 2366-2382.

Park, G. J., Osinski, A., & Hernandez, G. (2022). The mechanism of RNA capping by SARS-CoV-2. *Nature*, 609, 793-800. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05185-z>

Parvathy, S. T., Udayasuriyan, V., & Bhadana, V. (2021). Codon usage bias. *Molecular Biology Reports*, 49, 539-565. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06749-4>

Pekarek, L., Zimmer, M. M., Gribling-Burrer, A.-S., Buck, S., Smyth, R., & Caliskan, N. (2022). Cis-mediated interactions of the SARS-CoV-2 frameshift RNA alter its conformations and affect function. *Nucleic Acids Research*, 51(2), 728-743. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1184>

Penn, W. D., & Mukhopadhyay, S. (2022). Abracadabra, One Becomes Two: The Importance of Context in Viral -1 Programmed Ribosomal Frameshifting. *American Society for Microbiology*, 13(4). <https://doi.org/10.1128/mbio.02468-21>

Peterson, J. M., Becker, S. T., O'Leary, C. A., Juneja, P., Yang, Y., & Moss, W. N. (2024). Structure of the SARS-CoV-2 Frameshift Stimulatory Element with an Upstream Multibranch Loop. *Biochemistry*, 63(10), 1287-1296. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.3c00716>

QIAGEN. (2018). *QIAquick® Gel Extraction Kit QIAquick® PCR & Gel Cleanup Kit (cat. Nos. 28704, 28706, 28506 and 28115)*. <https://doi.org/QIAGEN>

QIAGEN. (2025). *Visualization of proteins in SDS-PAGE gels. QIAGEN Knowledge Hub*. <https://www.qiagen.com/es-es/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/protein/protein-analysis/visualization-of-proteins-in-sds-page-gels>

Ritesh, G., Prashanna, K., & Sadikshya, R. (2021). Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. *Bioinformatics and Biology Insights*, 15, 1-32.

Roman, C., Lewicka, A., Koirala, D., Li, N.-S., & Piccirilli, J. A. (2021). The SARS-CoV-2 Programmed -1 Ribosomal Frameshifting Element Crystal Structure Solved to 2.09 Å Using Chaperone-Assisted RNA Crystallography. *ACS chemical biology*, 16, 1469-1481. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00324>

Romano, M., Ruggiero, A., & Squeglia, F. (2020). A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells*, 9(1267), 1-22. <https://doi.org/doi:10.3390/cells9051267>

Sanderson, T., Hisner, R., & Donovan-Banfield, I. (2023). A molnupiravir-associated mutational signature in global SARS-CoV-2 genomes. *Nature*, 1-19. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06649-6>

Santos-López, G., Cortés-Hernández, P., Reyes-Leyva, J., Melgarejo de Gante, F., & Vallejo-Ruiz, V. (2021). Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2): Características estructurales, moleculares y ciclo replicativo. *Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla, Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla*.

Santos-López, G., Cortés-Hernández, P., Vallejo-Ruiz, V., & Reyes-Leyva, J. (2021). SARS-CoV-2: Basic concepts, origin and treatment advances. *GACETA MÉDICA DE MÉXICO*, 157(1), 84-89.

Saravolatz, L. D., Depcinski, S., & Sharma, M. (2022). Molnupiravir and Nirmatrelvir-Ritonavir: Oral Coronavirus Disease 2019 Antiviral Drugs. *Clinical Infectious Diseases*, 76(1), 165-171.

Sasse, J., & Gallagher, S. R. (2009). Staining Proteins in Gels. *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 10*(Unit 10.6.), 1-27.

Standing, J. F., Buggiotti, L., Guerra-Assuncao, J. A., Woodall, M., & Ellis, S. (2024). Randomized controlled trial of molnupiravir SARS-CoV-2 viral and antibody response in at-risk adult outpatients. *Nature Communications*, 15(1652), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45641-0>

Stevens, L. J., Pruijssers, A., Lee, H., Gordon, C., Tchesnokov, E., & Gribble, J. (2022). Mutations in the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase confer resistance to remdesivir by distinct mechanisms. *SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE*, 14, 1-15.

Sun, Y., Abriola, L., Niederer, R. O., Pedersen, S. F., Alfajaro, M. M., & Silva Monteiro, V. (2021). Restriction of SARS-CoV-2 replication by targeting programmed -1 ribosomal frameshifting. *PNAS*, 118(26), 1-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023051118>

- Szemiel, A. M., Agnieszka M., A., Orton, R. J., MacLean, O. A., & Pinto, R. M. (2021). In vitro selection of Remdesivir resistance suggests evolutionary predictability of SARS-CoV-2. *PLOS Pathogens*, 17(9), 1-24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009929>
- Tao, K., Tzou, P. L., & Nouhin, J. (2021). SARS-CoV-2 Antiviral Therapy. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4), 1-35.
- Thermo Fisher Scientific. (2014). *T4 DNA Ligase, 5 Weiss U/μL #EL0014*. <https://doi.org/Thermo Fisher Scientific>
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *Expi293™ Cells User Guide (MAN0006283)*. <https://doi.org/Thermo Fisher Scientific>.
- Thermo Fisher Scientific. (2020). *Expi293™ Expression System User Guide (MAN0019402)*. <https://doi.org/Thermo Fisher Scientific>
- Trinity, L., Wark, I., Lansing, L., Jabbari, H., & Ulrike, S. (2023). Shapify: Paths to SARS-CoV-2 frameshifting pseudoknot. *PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY*, 19(2), 1-30. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010922>
- Tsagkli, P., Geropeppa, M., Papadatou, I., & Spoulou, V. (2024). Hybrid Immunity against SARS-CoV-2 Variants: A Narrative Review of the Literature. *Vaccines*, 12(1051), 1-17. <https://doi.org/10.3390/vaccines12091051>
- Velthuis, A. J. W. te, Arnold, J. J., Cameron, C. E., Worm, S. H. E. van den, & Snijder, E. J. (2009). The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Research*, 38(1), 203-214. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gkp904>
- V'kovski, P., Kratzel, A., & Steiner, S. (2021). Coronavirus biology and replication: Implications for SARS- CoV-2. *Springer Nature*, 19, 155-170.
- Woo, P. C., de Groot, R. J., & Haagmans, B. (2023). ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023. *Journal of General Virology*, 104(4), 1-2.

- Yan, S., & Schlick, T. (2025). Heterogeneous and multiple conformational transition pathways between pseudoknots of the SARS-CoV-2 frameshift element. *BIOPHYSICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY*, 122(4), 1-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2417479122>
- Yan, S., Zhu, Q., Hohl, J., Dong, A., & Schlick, T. (2023). Evolution of coronavirus frameshifting elements: Competing stem networks explain conservation and variability. *BIOPHYSICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY*, 120(20), 1-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2221324120>
- Yan, S., Zhu, Q., Jain, S., & Schlick, T. (2022). Length-dependent motions of SARS-CoV-2 frameshifting RNA pseudoknot and alternative conformations suggest avenues for frameshifting suppression. *Nature Communications*, 13(4284), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31353-w>
- Zhao, J., Guo, S., & Yi, D. (2021). A cell-based assay to discover inhibitors of SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase. *Science Direct*, 190, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105078>
- Zymo Research. (2023). *ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kit, Catalog Numbers: D4202, D4203*. [https://doi.org/Zymo Research](https://doi.org/Zymo%20Research)